Uber die Inhaltsstoffe von KIGELIA pinnata

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

von

FAROUK GAMAL EL - TAYEB

aus Alexandria

1966

1966 W 88

Über die Inhaltsstoffe von KIGELIA pinnata

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

von

FAROUK GAMAL EL - TAYEB

aus Alexandria

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 1966
Dekan: Universitätsprofessor Dr. E. Wirth
Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. R. Pfleger
Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. O. Dann

Meinem hochverehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. Robert P f l e g e r,
bleibe ich für das Thema dieser Arbeit, für seine wertvollen Ratschläge und für die mir gewährte großzügige Hilfe stets zu Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung.....	1
II. Allgemeiner Teil	
A) Orientierende Vorversuche:	
α) Prüfung auf Alkaloide.....	8
β) Prüfung auf Sterine.....	9
γ) Prüfung auf ölige Bestandteile.....	12
B) Aufarbeitung der Droge:	
Extraktion der Droge.....	12
1) Versuche zum Sterinnachweis im "KIGELIA-Öl".	13
2) Versuche zur Anreicherung und Isolierung der Sterine I und II.....	16
C) Charakterisierung von Sterin I und II:	
Dünnschichtchromatographie und Vergleich mit bekannten Sterinen.....	34
Farbreaktionen.....	36
Schmelzpunkt und optische Aktivität.....	38
UV- und IR-Spektren.....	39
Strukturdiskussion von Sterin I.....	42
Strukturdiskussion von Sterin II.....	52
D) Versuche zum Nachweis der im verseifbaren Anteil des "KIGELIA-Öls" enthaltenen Fettsäuren:.	
a) Papierchromatographische Untersuchungen.....	54
b) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	56
c) Isolierung und Identifizierung der in dem "KIGELIA-Öl" vorliegenden Einzelkomponenten:	58
α) Kältefraktionierung.....	58
β) Fraktionierte Destillation und Gaschromatographie.....	58
γ) Nachweis und Isolierung "ungesättigter KIGELIA-Fettsäuren".....	66
E) Pharmakologische Untersuchungen der Sterine I und II und verschiedener Drogen-Extrakte.....	71

Seite

III. Experimenteller Teil

Beschreibung der Versuche 85

IV. Zusammenfassung 105

V. Literaturverzeichnis 107

I. Einleitung

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535725_0043

In den Tropen, vor allem in Zentral- und Südafrika, finden seit langer Zeit Bäume verschiedener KIGELIA-Arten eine vielseitige Verwendung. So werden sie von den afrikanischen Eingeborenen wegen ihres Holzes für den Bau von Booten und Kisten sehr geschätzt. In Tanganjika wird sowohl die reife als auch die unreife Frucht in gebackener Form zur Bierfermentation verwendet (1). In Hungerszeiten dient den Eingeborenen von Nyassaland der geröstete Samen als Nahrungsmittel (2).

Es ist weiter bekannt, daß insbesondere die KIGELIA pinnata, ein 10 - 15 m hoher Baum, im religiösen Zeremoniell der Zentralafrikaner eine wichtige Rolle spielt. Der Baum wird für heilig gehalten und darf deshalb nur zur Herstellung von Fetischen verwendet werden. Bei manchen Stämmen Zentralafrikas ist es auch Brauch, daß der Medizinmann dem Bräutigam in der Hochzeitsnacht ein kleines Fruchtstück zum Kauen übergibt, das ihm zu besonderer Fruchtbarkeit verhelfen soll *). Darüber hinaus beansprucht die KIGELIA pinnata wegen ihrer Verwendung in der Volksmedizin ein besonderes Interesse. So benutzen die Tongos bei Geschwüren die gepulverte unreife Frucht in Form von Umschlägen (3). Die Luvalen glauben, bei stillenden Müttern mit den Früchten durch lokale Anwendung an der Brust die Lactation steigern zu können; ebenso soll sich die lokale Behandlung des Kopfes hydroencephalitischer Kinder günstig auswirken (4). D.A. ROSENTHAL (5) erwähnte 1861 erstmalig die KIGELIA pinnata und berichtet, daß die reife Frucht ungenießbar sei und eine abführende Wirkung besitze.

G. DRAGENDORFF (6) und C.G. SANTESSON (2) bestätigten diese abführende Wirkung und weisen auf die Verwendung der unreifen Frucht in Form von breiigen Umschlägen bei Syphilis und Rheumatismus hin. Einer Privatmitteilung *) ist zu entnehmen, daß die gemahlenen Früchte mit Alkohol extrahiert werden und der dabei erhaltene ölige Extraktrückstand mit Vaseline (20 % Extraktgehalt) zu einer Salbe verarbeitet wird, die, von ägyptischen Ärzten verordnet, bei rheumatischen Erkrankungen mit Erfolg Anwendung findet.

---

*) Privatmitteilung von Dr. med. K. Samie/Kairo

In Zentralafrika sind auch einige Vergiftungsfälle durch Früchte der KIGELIA pinnata bekannt geworden, wobei jedoch keine näheren Angaben über Symptome irgendwelcher Art gemacht wurden. STEVENSON-HAMILTON (7) und A.A. PORDY (8) erwähnen lediglich, daß die unreifen Früchte sehr giftig sind und, in kleineren Mengen gekaut, als Aphrodisiacum benutzt werden.

In der Literatur wurden bisher über die Inhaltsstoffe der KIGELIA pinnata nur wenige und sich teilweise widersprechende Angaben gemacht, die die volksmedizinische und therapeutische Verwendung dieser Droge verständlich erscheinen lassen. Nach BOORSMA (9) soll die KIGELIA pinnata Gerbstoffe und Bitterstoffe enthalten, ohne daß hierzu nähere Angaben bezüglich der untersuchten Pflanzenteile gemacht werden. M.E. WALL et al. (10) zeigen an Hand eines mit einer Reihe verschiedener tropischer Pflanzen durchgeführten Tests, daß KIGELIA pinnata keine Haemolytica, Flavone, Antibiotica und Tannine enthält. K.S. PANKAJAMANI und T.R. SESHADRI (11), die sich mit den Anthoxanthinen indischer Blütenpflanzen beschäftigten, haben in dem alkoholischen Blütenextrakt von KIGELIA pinnata papierchromatographisch Quercetin und Kampferol nachweisen können und das Vorliegen eines weiteren Flavonderivates wahrscheinlich gemacht. S.L. BATHIA und LAL. MANOHER (12) untersuchten die adsorptiven Eigenschaften pflanzlicher Kohle und geben im Hinblick auf KIGELIA pinnata (KIGELIA pinnatta) an, daß die reifen Früchte beim Veraschen einen Gehalt an Mineralstoffen von etwa 17 % aufweisen.

Bei der chemischen Bearbeitung einer im allgemeinen noch recht wenig untersuchten Droge empfiehlt es sich bezüglich der zu erwartenden Inhaltsstoffe, diese Pflanze anderen Arten und Gattungen der gleichen Familie gegenüberzustellen, deren Inhaltsstoffe und Verwendungsart in der Literatur bereits Erwähnung fanden.

Die KIGELIA pinnata zählt zu den Bignoniaceen, einer etwa 450 Arten umfassenden Familie, die botanisch den Nachtschattengewächsen (Solanaceen) und Rachenblütlern (Scrophulariaceen) nahe steht. Trotz dieses Artenreichtums sind bisher nur wenige KIGELIA-Arten auf Inhaltsstoffe hin untersucht worden.

Die in der Literatur erwähnten, ebenfalls in den Tropen heimischen und meist auch baum- und strauchartigen Bignoniaceen und die daraus isolierten Verbindungen sowie ihre volksmedizinische Verwendung sind in nachstehender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 1

Bignoniaceae	Lit.	Vorkommen	Inhaltsstoffe	Volksmed. Bedeutung u. sonstige Literaturhinweise		Verwendeter Pflanzenteil
KIGELIA-Arten:						
K. abyssinica A. Rich.	(8)	Abessinien	- *)	Aphrodisiacum		-
K. aethiopica Dence.	(8)	Abessinien	-		in Erythräa officinell	-
K. pinnata D.C.	(11)	Inner- und Südafrika	-	Antirheumaticum Aphrodisiacum	Antisyphiliticum Purgans	unreife Frucht reife Frucht
BIGNONIA-Arten:						
B. capreolata L.	(8)	Virginien	-	giftig		-
B. depauperata	(8)	Westindien Brasilien	-		Antisyphiliticum	-
B. leucoxylum L.	(8)	Jamaica	-	Fischgift		Holz
Calosanthes indica Bl.	(8)	Indien Java	Catalpin Oroxylin	Antirheumaticum	Adstringens	Wurzelrinde
Cybistax antisyphilitica Mart.	(8)	Brasilien	-		Diurecticum, Antisyphiliticum, bei Leber- u. Milzleiden	Blätter
Dolichandra falcata Seem.	(8)	Indien	-	Fischgift	Abortivum	Rinde
Dolichandrone Rheedii Wall.	(8)	Indien	-	Antispasmodicum	als Nervensalbe	Same
JACARANDA-Arten:						
J. acutifolia H.u. B.	(8)	Peru	-		Antisyphiliticum, Adstringens, bei Bubonen	Frucht
J. copaia Don.	(12)	Brasilien	Alkaloide Carobasäure Harz Gerbstoff	Antirheumaticum Gichtmittel	Antisyphiliticum, bei Bubonen	Blatt
Spathodea Stipulata Wall.	(11)	Java	Alkaloide Gerbstoffe		-	-
TECOMA-Arten:						
T. impetiginosa Mart.	(8)	Brasilien	-	bei Gelenkentzündung,	Adstring. b. Ausschlägen	-
T. ochracea Cham.	(8)	Brasilien	Alkaloide		Antisyphiliticum, Adstring..	
T. radicans Juss.	(8)	Nordamerika	-	Fischgift	als Augen- u. Gurgelwasser, gegen Flechten	Blatt u. Rinde
T. stans Juss.	(11)	Westindien	Alkaloide		Diureticum	-

*) - = Keine Literaturangaben

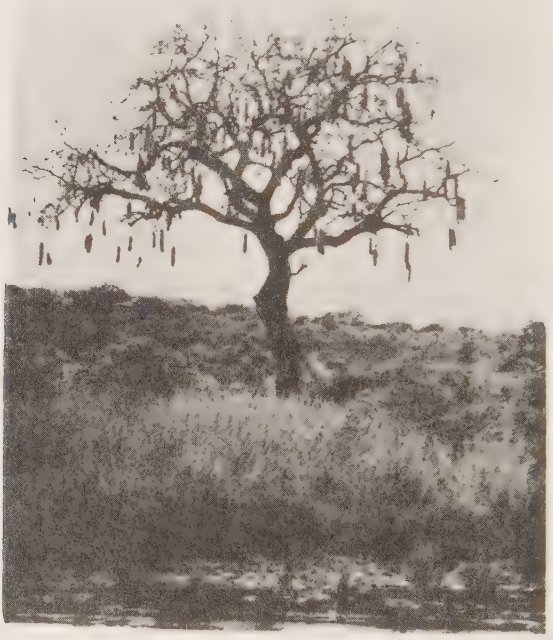
Diese Zusammenstellung zeigt zwar, daß aus Bignoniaceen bisher Verbindungen recht unterschiedlicher Stoffnatur gewonnen werden konnten, so z.B. Gerbstoffe, harzartige Bestandteile, Alkaloide u.a., sie läßt aber keine häufig anzutreffende Stoffklasse erkennen, die für die vorliegende Arbeit hätte wegweisend sein können. Es fällt jedoch auf, daß mehrere Bignoniaceen ziemlich giftig sein sollen und in der Volksmedizin in gleicher Weise wie KIGELIA pinnata als Antirheumaticum und Aphrodisiacum verwendet werden. Die Giftigkeit und der Anwendungsbereich dieser Drogen könnte als Hinweis für das Vorliegen von Alkaloiden und Sterinen mit hormonartigen Eigenschaften gelten; ein Gehalt an Alkaloiden, beispielsweise vom Typ des Yohimbins, oder von im Pflanzenbereich vorkommenden, Thelykinine genannten weiblichen Sexualhormonen, ließe dann die volksmedizinische Verwendung der KIGELIA pinnata als Aphrodisiacum verständlich erscheinen. Besonderes Interesse sollte die Untersuchung auf Sterine beanspruchen, da diesbezüglich in der Literatur bisher noch keine Angaben gemacht wurden und eventuell vorhandene Sterine für die erfolgreiche Behandlung rheumatischer Erkrankungen (2,6) mitverantwortlich gemacht werden könnten. Auch wegen der abführenden Eigenschaften der KIGELIA pinnata dürfte ein Gehalt an fetten Ölen von Bedeutung sein, da manchen pflanzlichen Ölen, z.B. Oleum Ricini eine solche Wirkung zu eigen ist.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die reifen Früchte von KIGELIA pinnata auf Alkaloide, Sterine und ölige Bestandteile zu untersuchen, die möglicherweise einen Zusammenhang zwischen Inhaltsstoffen dieser Art und den der volksmedizinischen Verwendung der Droge aufzeigen bzw. wahrscheinlich machen.

Eine weitere Aufgabe der Arbeit ist es, tierexperimentelle Untersuchungen mit verschiedenen Extrakten und Reinsubstanzen, die sich eventuell daraus gewinnen lassen, durchzuführen. Vielleicht lassen sich hierbei Zusammenhänge der genannten Art erkennen.

II. Allgemeiner Teil

KIGELIA pinnata D.C. ist ein in Zentral- und Südafrika sowie Süd-Rhodesien beheimateter, 10 bis 15 m hoher Baum mit weitverzweigter Krone, der wegen seiner Fruchtform auch Leberwurstbaum genannt wird. In Zentralafrika und im Süden des Sudan wird er Nibxi Nisiri genannt, im nördlichen Sudan, wo er als schattenspendender Chausseebaum angepflanzt wird, ist er unter dem Namen Om Elschetur bekannt.



KIGELIA pinnata zur Reifezeit

Botanische Merkmale (13) sind vor allem die paarig gefiederten, schwach behaarten Blätter, die 20 bis 25 cm lang und 9 cm breit werden.

Die Blüten hängen an bis 5 m langen, strickförmigen Blütenstielen. Die auf der Außenseite gelb punktierten roten oder

orangegelben Blütenblätter, die zu einer bauchig-glockigen 20 cm großen Blumenkrone angeordnet sind, werden von glokkigen, 10 cm großen Kelchblättern unregelmäßig umschlossen.

Die Staubbeutelhälften sind gleichlaufend oder auseinanderfahrend. Die Fruchtknoten sind vollkommen fächerig.

Die Früchte sind 30 bis 50 cm lang, leberwurstförmig, umschlossen von einer harten dicken Rinde. Sie können 4 kg schwer werden.

KIGELIA-Früchte

Quer- und Längsschnitt durch die Frucht

A) Orientierende Vorversuche

Für die nachstehenden Vorversuche war es erforderlich, die reifen Früchte der KIGELIA pinnata mechanisch in Samen- und Fruchtschalenmaterial aufzuteilen, so daß die orientierenden Untersuchungen auf Alkaloide, Sterine und ölige Bestandteile eine Aussage darüber ermöglichen, ob Inhaltsstoffe der genannten Art nur in den Samen oder Fruchtschalen vorkommen oder in beiden Fruchtelementen anzutreffen sind. Hierbei hat sich folgende prozentuale Verteilung ergeben:

Samenanteil	:	15 %
Fruchtschalenanteil	:	85 %

Das mittlere Samengewicht beträgt 108 mg (Mittelwert bestimmt aus 50 Stück Einzelsamen).

α) Prüfung auf Alkaloide:

Eine kleinere Menge (ca. 100 g) gepulverte Gesamtdroge wurde zunächst mit Petroläther vollständig entfettet und anschließend mit ammoniakalischem Chloroform nach dem Perkolatorprinzip extrahiert. Das Perkolat wurde mit verdünnter Schwefelsäure gegengeschüttelt und die in der Wasserphase bzw. Chloroformphase eventuell vorhandenen Alkaloide normaler bzw. geringer Basizität im Spottest oder im Reagenzglas mit einer Reihe von Alkaloidfällungsreagenzien (s. S. 85) nachzuweisen versucht.

Außerdem wurde gepulverte und entfettete Gesamtdroge mit 10 %iger Schwefelsäure einige Stunden mazeriert und das Filtrat anschließend in gleicher Weise auf Alkaloide geprüft.

Unabhängig von der jeweiligen Extraktionsart konnten in keinem Fall Alkaloide durch Fällungsreagenzien nachgewiesen werden, so daß die Samen und Fruchtschalen der KIGELIA pinnata alkaloidfrei sein mußten, und die volksmedizinische Verwendung der Frucht als Antirheumaticum und Aphrodisiacum nicht durch einen gewissen Gehalt an Alkaloiden zu erklären ist.

ß) Prüfung auf Sterine:

Eine geringe Samenmenge (250 g) wurde zerkleinert, im Soxhlet-Apparat nacheinander mit Petroläther, Chloroform, Äther und Alkohol jeweils erschöpfend extrahiert und die dabei erhaltenen Extrakte vom Lösungsmittel befreit. In Tabelle 2 sind die prozentualen Anteile der Extrakte, bezogen auf die ursprüngliche Samenmenge, sowie die Beschaffenheit der Extrakte wiedergegeben. Sie zeigt, daß die Samen etwa 25 % extrahierbare Bestandteile enthalten.

Tabelle 2

Fraktionierte Extraktion der Samen von KIGELIA pinnata

Lösungsmittel	Extraktanteile (bezogen auf eingesetzte Samenmenge)	Beschaffenheit
Petroläther	18,45 %	gelbliche, ölige Flüssigkeit von eigenartigem Geruch
Chloroform	0,65 %	dunkelbraune, teigartige Masse
Äther	0,22 %	hellbraune, zähflüssige, teilweise kristalline Masse
Alkohol	5,33 %	dunkelbraune, zähflüssige Masse von karamelartigem Geruch und süßem Geschmack
Insgesamt:	24,65 %	

In gleicher Weise wurde das sehr zähe und faserige Fruchtschalenmaterial (1,5 kg) im Soxhlet-Apparat nacheinander mit Petroläther, Chloroform und Methanol erschöpfend extrahiert. Die bei dieser fraktionierten Extraktion erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 wiedergegeben und zeigen, daß das Fruchtschalenmaterial zum Unterschied vom Samenmaterial wesentlich weniger extrahierbare Bestandteile (ca. 8 %) enthält.

Tabelle 3

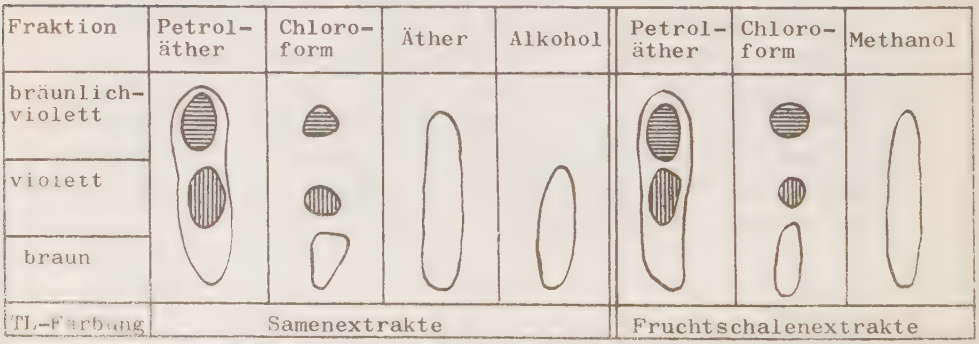
Fraktionierte Extraktion der Fruchtschalen von KIGELIA pinnata

Lösungsmittel	Extraktanteile (bezogen auf eingesetzte Fruchtschalenmenge)	Beschaffenheit
Petroläther	6,4 %	gelbliche, ölige Flüssigkeit von eigenartigem Geruch
Chloroform	0,23 %	dunkelbraune, teigartige Masse
Methanol	1,20 %	dunkelbraune, zähflüssige Masse von karamelartigem Geruch und süssem Geschmack
insgesamt:	7,83 %	

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der aus Samen und Fruchtschalen erhaltenen Extrakte zeigten, daß vor allem in den Petrolätherextrakten zwei mit Antimon-III-chlorid violett bzw. braun-violett anfärbbare Komponenten enthalten sind, bei denen es sich um Sterine handeln konnte. Extrakte aus Samen- und Fruchtschalenmaterial, die mit den gleichen Lösungsmitteln gewonnen wurden, waren dünnschichtchromatographisch qualitativ identisch, nur quantitativ waren gewisse Unterschiede zu erkennen, wie dies auch nachstehende Chromatogrammskizze schematisch zum Ausdruck bringt:

Chromatogrammskizze 1

(Kieselgel G ; Fließmittel: Benzol-Cyclohexan (1+1))



Anm.: TL = Tageslicht

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden allerdings durch eine ziemlich starke Zungenbildung vom Start bis zur Lösungsmittelfront beeinträchtigt, was durch den hohen Ölgehalt vor allem der Petrolätherextrakte bedingt war, so daß diese vergleichenden Betrachtungen nur wegweisend sein konnten.

Diese Versuche ließen jedoch erkennen, daß die recht mühsame und langwierige Trennung der KIGELIA Früchte in Samen- und Fruchtschalenmaterial nicht notwendig ist und die Gesamtdroge nach feiner Vermahlung zur Verarbeitung kommen konnte.

Da in dem petroläther-löslichen Anteil mit Hilfe der für viele Sterine charakteristischen Antimon-III-chlorid-Farbreaktion das Vorhandensein von mindestens zwei Sterinen wahrscheinlich gemacht werden konnte, erschien es sinnvoll, die Droge unter diesem Gesichtspunkt zu bearbeiten, so daß hierbei möglicherweise ein Zusammenhang mit der volksmedizinischen Verwendung der Droge zu erwarten war.

Ein hoher Steringehalt würde die Droge dann zusätzlich interessant machen, wenn diese Sterine sich als Vorstufe für die Darstellung wertvoller Sexualhormone oder Corticosteroide verwenden ließen.

δ) Prüfung auf ölige Bestandteile:

Die Petrolätherextrakte des Samens und der Fruchtschalen ließen infolge der positiv verlaufenen Fettfleckenprobe einen Gehalt an pflanzlichem Öl erwarten, das an späterer Stelle (s. S. 54) durch Bestimmung einer Reihe von Kennzahlen und Isolierung von aliphatischen Fettsäuren nach vorheriger Verseifung des mit Petroläther aus der Gesamtdroge extrahierbaren Anteils charakterisiert wird.

B) Aufarbeitung der Droge

Wie bereits angedeutet (vgl. S. 11), kann die Gesamtdroge als solche zur Extraktion verwendet werden, da bezüglich des Gehaltes an Sterinen und öligen Bestandteilen bei Samen- und Fruchtschalenmaterial praktisch nur quantitative Unterschiede zu bestehen scheinen.

Für die Extraktion wurde deshalb die Gesamtdroge maschinell sehr fein pulverisiert und nach dem Einschlämmen mit Petroläther in ein Extraktionsrohr mit Petroläther nach dem Perkolationsprinzip erschöpfend extrahiert und der Extrakt vom Lösungsmittel befreit. Hierbei wurden statt des gemäß Tabelle 2 und 3 und der prozentualen Zusammensetzung der Gesamtdroge (vgl. S. 9) zu erwartenden extrahierbaren Anteils von insgesamt 8,2 % der Gesamtdroge nur 5,3 % gefunden. Diese geringere Ausbeute mag einmal darauf zurückzuführen sein, daß obiges Verfahren bei Raumtemperatur, die Soxhlet-Extraktion dagegen in der Wärme ausgeführt wird. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß beide Ergebnisse verschiedenen Drogenlieferungen zuzuordnen sind, so daß auch unterschiedliche Erntezeiten, klimatische Verhältnisse und Trocknungsverhältnisse hierbei eine gewisse Bedeutung haben werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der mit Petroläther aus den reifen Früchten der KIGELIA pinnata extrahierbare Anteil der Einfachheit wegen "KIGELIA-Öl" genannt.

1) Weitere Versuche zum Sterinnachweis im KIGELIA-Öl

Bekanntlich lassen sich Sterine papierchromatographisch und dünnschichtchromatographisch durch verschiedene Farb- und Fluoreszenzreaktionen nachweisen, die teils spezifischer, teils unspezifischer Natur sind. So können nach J.M. HAIS und K. MACEK (14) auf papierchromatographischem Wege durch Anwendung verschiedener Nachweisreaktionen gewisse Aussagen über die Gruppenzugehörigkeit eines Sterines gemacht werden. Es werden folgende Reaktionen unterschieden:

a) Reaktionen mit geringer Spezifität,
b) Reaktionen mit Gruppenspezifität,
c) Reaktionen mit enger Gruppenspezifität.

Die hierzu erforderlichen Reagenzien, sowie die Ausführung der Farbreaktion seien kurz angeführt:

a) Reaktionen mit geringer Spezifität:

α) Phosphorsäure-Reaktion:
Das getrocknete Papierchromatogramm wird mit 15 %iger Phosphorsäure durchtränkt, 20 Min. lang auf 90° C erhitzt und im UV-Licht ausgewertet: Sterine geben sich als fluoreszierende Flecken zu erkennen.

β) Schwefelsäure-Reaktion:
Das getrocknete Papierchromatogramm wird mit konz. Schwefelsäure besprüht und sofort im UV-Licht ausgewertet: Sterine, aber auch Glykoside, Alkaloide, Amine werden als fluoreszierende Flecken sichtbar.

γ) Antimon-III-Reaktion:
Das getrocknete Papierchromatogramm wird mit 50 %iger Antimon-III-chlorid Lösung in Eisessig oder mit Antimon-III-chlorid gesättigtem Chloroform besprüht und 5 Minuten lang auf 110°C erhitzt:
Sterine färben sich hierbei violett bis blau an; im UV-Licht werden Fluoreszenzfärbungen beobachtet.

b) Reaktionen mit Gruppenspezifität:

α) Phosphormolybdänsäure-Reaktion:
Das Papierchromatogramm wird mit 5 %iger Phosphormolybdän-

säure in Äthanol besprüht und 5 Min. auf 90°C erhitzt: Steroidsäuren, Gallensäuren, aber auch Glykoside erscheinen als blaue Flecken auf gelbem Grund.

β) Dimethylamino-benzaldehyd-Reaktion:
Das Papierchromatogramm wird mit einer Mischung von 5 ml 5 %iger p-Dimethylaminobenzaldehydlösung in Cyclohexan, 12 ml Acetanhydrid und 1 ml konz. Schwefelsäure besprüht: Steroidsäuren, aber auch aromatische Amine und Indolderivate werden als intensiv gelbe Flecken sichtbar, die allmählich in orange übergehen.

γ) Dinitrophenylhydrazin-Reaktion:
Das Papierchromatogramm wird mit einer 0,4 %igen 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung in 2n-Salzsäure besprüht: Steroidsäuren geben sich als gelbe Flecken zu erkennen.

c) Reaktionen mit enger Gruppenspezifität dürften sich im Rahmen dieser orientierenden Versuche erübrigen, da noch keine Reinsubstanzen vorliegen und Begleitstoffe Reaktionen dieser Art wesentlich beeinflussen können.

Obgleich bei der Untersuchung von Rohextrakten auch mit gewissen Störungen der "Nachweisreaktionen mit geringer Spezifität bzw. mit Gruppenspezifität" zu rechnen ist, wurden Versuche dieser Art unternommen, um einen besseren Hinweis für das Vorhandensein von Sterinen im KIGELIA-Öl zu erhalten, als dies bei den orientierenden Versuchen der Fall war. Die papierchromatographischen Ergebnisse wind in der Tabelle 4 zusammengestellt und zeigen, daß mindestens zwei Sterine in dem KIGELIA-Öl enthalten sind, die im Rahmen dieser Arbeit Sterin I und Sterin II genannt werden. Für Sterin I ist die blauviolette Färbung, für Sterin II eine etwas bräunlich violette Färbung charakteristisch, die bei der Antimon-III-chlorid-reaktion erhalten wird. Eine eindeutigere Unterscheidung der beiden Sterine ist zusätzlich im UV-Licht gegeben:
Sterin I erscheint als orangefarbiger, Sterin II als grüner Farbflecken.

Tabelle 4

Papierchromatographie des KIGELIA-Öls:

R_f-Werte		0	0,32	0,56
Nachweisreaktionen:		Färbung bzw. Fluoreszenzen im Tageslicht bzw. UV-Licht.		
a) Reaktionen mit geringer Spezifität:				
α) Phosphorsäure-Reaktion:	TL	-	-	-
	UV	-	blau	grün
ß) Schwefelsäure-Reaktion:	TL	grau/schwarz	rötlich	rötlich
	UV	-	hell	hell
γ) Antimon-III-chlorid-reaktion:	TL	-	blauviolett	braun-violett
	UV	rötlich	orange	grün
b) Reaktionen mit Gruppenspezifität:				
α) Phosphormolybdänsäure-Reaktion:	TL	-	-	-
ß) Dimethylaminobenzaldehyd-Reaktion:	TL	-	-	-
γ) Dinitrophenylhydrazin-Reaktion:	TL	-	-	-
Bezeichnung			Sterin I	Sterin II

Papierchromatographische Versuchsbedingungen:

Papierimprägnierung	: Papier S & S Nr. 2043 a wurde mit einer 10 %igen Paraffinöl-Lösung (Paraffinöl f. IR-Spektroskopie) in Benzol durchtränkt und luftgetrocknet.
Fließmittel	: Eisessig-Chloroform-Paraffinöl (65+25+10)
Methode	: aufsteigend
Laufzeit/Laufstrecke	: 15 Std./25 cm

In Ergänzung zur Chromatogrammskizze 1 sei hier noch der papierchromatographische Vergleich von Petrolätherextrakten aus Samen- und Fruchtschalenmaterial sowie der Gesamtdroge angefügt, der in gleicher Weise erkennen läßt, daß Sterin I und II nicht etwa auf einen bestimmten Drogenteil beschränkt vorkommen, sondern im Samen und in der Fruchtschale gleichzeitig anzutreffen sind.

Chromatogrammskizze 2

Papierchromatographischer Vergleich verschiedener Petroläther-Extrakte

(Antimon-III-chlorid-Färbung)

TL-Färbung	Gesamtdroge	Samen	Frucht-schale	UV-Fluoreszenzen
grau				blau*) Front
braun				-
bräunlich violett				grün Sterin II
violett				orange Sterin I
braun				rötlich braun Start

*) Auch vor Behandlung mit Antimon-III-Chlorid

Papierchromatographische Versuchsbedingungen: wie Tabelle 4 (vgl. S. 15).

2) Versuche zur Anreicherung und Isolierung der Sterine I und II

Da bei der Isolierung unbekannter Naturstoffe immer damit zu rechnen ist, daß diese durch die Art der Aufarbeitung einer Droge verändert werden, war es notwendig, möglichst schonende Versuchsbedingungen zu wählen. Es wurde deshalb von der meist gebräuchlichen Methode, Sterine aus dem unverseifbaren Anteil zu gewinnen, vorerst abgesehen und versucht, durch Verteilungs- oder Adsorptionschromatographie die Sterine anzureichern. Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung von Sterinen bot sich für den Fall an, daß Sterin I oder II Ketonstruktur hat und infolgedessen über wasserlösliche GIRARD-T-Verbindungen angereichert und von öligen Bestandteilen sowie wasserlöslichen Nichtketonen unschwer abgetrennt werden kann.

a) 4-Stufige Craig-Verteilung des KIGELIA-Öls:

Eine 4-stufige Craig-Verteilung konnte über den lipophilen Charakter der beiden Sterine und damit für ihre Isolierung eine gewisse Aussage ermöglichen. Es wurde deshalb eine 4-stufige Craig-Verteilung des KIGELIA-Öls in dem System Methanol-Petroläther (2,52 g Kigelia-Öl; Ober- und Unterphase je 100 ml) in üblicher Weise durchgeführt. wobei die Unterphase die mobile Phase darstellte. Die prozentuale mengenmäßige Verteilung des KIGELIA-Öls über die vier Unter- bzw. Oberphasen ist in Tabelle 5, der papierchromatographische Vergleich der einzelnen Fraktionen schematisch in der Chromatogrammskizze 3 wiedergegeben:

Tabelle 5

4-Stufige Craig-Verteilung des KIGELIA-Öls

Element	Auswaage in mg	Prozentuale Verteilung der Auswaage auf	
		Oberphase (Petroläther)	Unterphase (Methanol)
0	448	88,9 %	11,1 %
1	1410	51,7 %	48,3 %
2	392	48,9 %	51,1 %
3	242	62,0 %	38,0 %
0-3	2492		

Chromatogrammskizze 3
(Antimon-III-chlorid-Färbung)

Element Nr.	0	1	2	3	0	1	2	3
grau bräunlich-violett violett braun								
TL-Färbung	Unterphase				Oberphase			

PC-Versuchsbedingungen wie bei Tabelle 4 angegeben (vgl. S. 16)

Die papierchromatographische Untersuchung der einzelnen Fraktionen läßt trotz der weitgehend gleichen prozentualen Verteilung auf Ober- und Unterphase (vgl. Tabelle 5) deutlich erkennen, daß es in den Unterphasen zu einer Anreicherung des Steringemisches kommt, während in den Oberphasen vor allem Substanzen mit niedrigem R_f-Wert (Antimonchlorid-Färbung: braun) angereichert werden. Eine vielstufige Craig-Verteilung läßt sicher eine bessere Abtrennung des Steringemisches erwarten; inwieweit aber damit auch eine Trennung des Steringemisches selbst zu erzielen ist, war aufgrund dieses orientierenden Vorversuches nicht vorauszusehen. Außerdem war einer adsorptionschromatographischen Trennung des in Element O angereicherten Steringemisches der Vorzug zu geben, nachdem sich dünnschicht-chromatographisch an Aluminiumoxid eine ähnliche Trennung der Sterine hat erreichen lassen wie auf papierchromatographischem Wege.

Der Rückstand aus Element O wurde deshalb in Äther gelöst und an Aluminiumoxid (nach Brockmann) unter Verwendung von Äther als Elutionsmittel chromatographiert. Durch weitgehende Fraktionierung der im UV-Licht fluoreszierenden Zonen und des Nachlaufes gelang es hierbei (vgl. nachstehendes Schema), einige Fraktionen (B, C) abzutrennen, die dünnschichtchromatographisch, wie nachstehende Chromatogrammskizze 4 zeigt, praktisch nur Sterin II bzw. I enthalten. Charakteristisch für Sterin II ist insbesondere die grüne Fluoreszenz an Aluminiumoxid im UV-Licht, die bei der Dünnschichtchromatographie an Silicagel nicht auftritt.

Schema 1

UV-Fluoreszenz		eluierbar mit Äther als:
farblos		Fraktion C
grün		Fraktion B
blau		Fraktion A

Chromatogramm-Skizze 4
(Antimon-III-chlorid-Färbung)

TL-Färbung	Ausgangsmaterial	Fraktion A (F_p=52°C)	Fraktion B (Sterin II)	Fraktion C (Sterin I)	UV-Fluoreszenz
grau					blau*)
bräunlich-violett					grün
violett-blau					orange

*) auch vor Behandlung mit Antimon-III-chlorid

DC-Versuchsbedingungen:

Aluminiumoxid-G-Platten
Fließmittel : Petroläther-Cyclohexan (8+2);
Sprühreagenz : Antimon-III-chlorid (vgl. S. 13).

Obwohl die Fraktionen B und C dünnschichtchromatographisch einheitlich zu sein schienen, wurden bei Kristallisationsversuchen aus verschiedensten Lösungsmitteln stets amorphe Produkte erhalten.

Allein aus Fraktion A ließ sich ein kristallines Produkt vom Schmelzpunkt 52°C isolieren. Eine weitere Bearbeitung dieses Produktes war im Rahmen dieser Arbeit wenig sinnvoll, da es nur in sehr geringer Menge erhalten wurde und sich bisher keinerlei Hinweise für dessen Sterinnatur ergeben hatten.

Da sich adsorptionschromatographisch an Aluminiumoxid eine, wenn auch mengenmäßig nur geringe Trennung der Sterine I und II hat erreichen lassen, wurde zur Gewinnung etwas größerer Sterinmengen versucht, an Stelle der durch eine 4-stufige-Craig-Verteilung nur in geringer Menge erhältlichen Sterinfraktion (Element O) das KIGELIA-Öl selbst an Aluminiumoxid zu chromatographieren.

b) Chromatographie des KIGELIA-Öls an Aluminiumoxid:

KIGELIA-Öl (10 g) wurde an Aluminiumoxid (Säulenlänge: 50 cm; Ø : 2,5 cm) unter Verwendung von Petroläther, Aceton, Essigester, Chloroform und abs. Alkohol chromatographiert, jede 10. der erhaltenen Eluatfraktionen (10 ml) dünnschichtchromatographiert und entsprechend ihrer Sterinzusammensetzung so vereinigt, wie es Tabelle 6 zum Ausdruck bringt.

Tabelle 6

Chromatographie des KIGELIA-Öls an Aluminiumoxid

Fraktion Nr.	Lösungsmittel	Gesamt-eluat (ml)	Eluat-rückstand (mg)	Zusammensetzung
1 - 80	Petroläther	800	12	blaufluoreszierende Sub.
81 - 173	Petroläther	920	88	überwiegend St. II + blaufluoreszierende Substanz
174 - 239	Petroläther	660	168	Praktisch nur Sterin II
240 - 419	Petroläther	1800	440	überwiegend Sterin I neben II
420 - 760	Petroläther	3410	900	Praktisch nur Sterin I
761 - 930	Petroläther	1700	7572	Praktisch nur Fettanteile
931 - 1118	Petroläther	1880	-	-
1119 - 2118	Aceton	10000	-	-
2119 - 3118	Essigester	10000	-	-
3119 - 3618	Chloroform	5000	-	-
3619 - 3818	abs. Alkohol	5000	-	-
insgesamt:			9180	

Der Tabelle 6 ist zu entnehmen, daß sich durch Chromatographie des KIGELIA-Öls an Aluminiumoxid, wenn auch nur durch zeitraubende Fraktionierung, Sterin I und II in praktisch reiner Form abtrennen lassen. Diese beiden Sterinfraktionen waren nun für Vergleichszwecke mit auf einfachere, jedoch weniger schonende Weise aus dem KIGELIA-Öl erhältlichen Sterinfraktionen geeignet, um feststellen zu können, ob die Art der Aufarbeitung des KIGELIA-Öls die enthaltenen Sterine etwa verändern würde (s. S. 19).

c) Behandlung des KIGELIA-Öls mit GIRARD-T-Reagenz:

Sollten Sterin I und II Ketonstruktur haben, dann war die Möglichkeit gegeben, diese über wasserlösliche GIRARD-T-Verbindungen von dem KIGELIA-Öl in schonender Weise abzutrennen.

Versuche dieser Art wurden so ausgeführt, daß KIGELIA-Öl in alkoholischer Lösung mit GIRARD-T-Reagenz (15) in Gegenwart von 10 %iger Essigsäure unter Rückfluß behandelt wurde. Nach starker Verdünnung mit Wasser und Extraktion mit Äther sollten die Nichtketone in der Ätherphase, die Ketone als GIRARD-T-Verbindung in der Wasserphase vorliegen, aus der sich die Ketone regenerieren lassen. Ein dünnschichtchromatographischer Vergleich der "Keton-" und "Nichtketon-Fraktion" ließ bezüglich Sterin I und II qualitativ keinen Unterschied erkennen, d.h. in beiden Fraktionen waren diese Sterine vorhanden. Da bei weiteren chromatographischen Trennungsversuchen dieser beiden Fraktionen an Aluminiumoxid sich keinerlei Unterschied herausarbeiten ließ, muß angenommen werden, daß unter den Bedingungen obiger GIRARD-Trennung zumindest auch eine gewisse Löslichkeit der beiden Sterine in dem Wasser-Alkohol-Gemisch gegeben war und infolgedessen beide Sterine sowohl in der Nichtketon-Fraktion als auch in der Keton-Fraktion gefunden werden mußten. Es ist deshalb kaum anzunehmen, daß Sterin I bzw. II Ketonstruktur besitzen (s. S. 44, 45, auch S. 52).

d) Verseifung des KIGELIA-Öls:

KIGELIA-Öl wurde mit methanolisch-wässeriger Kalilauge zunächst bei Raumtemperatur, anschließend weitere 12 Stunden unter Rückfluß und Stickstoffatmosphäre verseift und in sonst üblicher Weise aufgearbeitet. Der unverseifbare Anteil wurde zur vollständigen Verseifung ein zweites Mal in gleicher Weise behandelt. Hierbei hat sich ergeben, daß der unverseifbare Anteil des KIGELIA-Öls etwa 9 %, und der in Form von Fettsäuren sich ergebende verseifbare Anteil etwa 75 % beträgt.

Der unverseifbare Anteil wurde durch adsorptive Filtration an Kieselgel unter Verwendung von Cyclohexan-Essigester (70 + 30) gereinigt. Einen dünnschichtchromatographischen Vergleich des hierbei erhaltenen gereinigten unverseifbaren Anteils mit

den auf schonendere Weise gewonnenen Sterinfraktionen (vgl. S. 19) zeigt die folgende Chromatogrammskizze 5:

Chromatogramm-Skizze 5
(Antimon-III-chlorid-Färbung)

TL-Färbung	UV-Fluoreszenz	Unverseifbarer Anteil	Fraktion C (Sterin I)	Fraktion B (Sterin II)
grau braun	blau*)			
bräunlich-violett	-			
violett-blau	orange			
blau	blau			
braun	-			

*) auch vor Behandlung mit Antimon-III-chlorid

DC-Versuchsbedingungen:

Kieselgel-G-Platten;
Fließmittel : Cyclohexan-Essigester (70 + 30)
Sprühreagenz : Antimon-III-chlorid.

Dieser Versuch läßt erkennen, daß die in dem KIGELIA-Öl enthaltenen Sterine bei der Aufarbeitung des Öls durch Verseifung zumindest nicht so verändert werden, daß sich dünnschichtchromatographisch ein Unterschied zu den auf schonendere Weise gewonnenen Sterinfraktionen (vgl. S.14, 15, 16, 19 und 21) erkennen läßt. Durch Abtrennung des verseifbaren Anteils und der damit verbundenen Sterinanreicherung ließ sich außerdem das Vorliegen eines weiteren Sterins (Sterin III) wahrscheinlich machen, das sich bei der Antimon-III-chlorid-reaktion durch Blaufärbung zu erkennen gibt.

e) Versuch zur Isolierung der Sterine aus dem unverseifbaren Anteil des KIGELIA-Öls:

Da sich bei den Vorversuchen zur Anreicherung der Sterine durch eine 4-stufige Craig-Verteilung ergeben hatte, daß sich Substanzen mit einem $R_f \sim 0$ auf diese Weise abtrennen lassen, war nun zu prüfen, ob durch eine 26-stufige Craig-Verteilung des unverseifbaren Anteils die Sterine sich weiter anreichern und eventuell gleichzeitig trennen lassen.

f) 26-stufige Craig-Verteilung des unverseifbaren Anteils des KIGELIA-Öls:

Der unverseifbare Anteil des KIGELIA-Öls wurde einer 26-stufigen Craig-Verteilung in dem System Methanol-Petroläther (2,0 g Öl; mobile Ober- und stationäre Unterphase je 50 ml) in üblicher Weise unterworfen. Die mengenmäßige Verteilung des unverseifbaren Anteils über die 26 Elemente ist in der Tabelle 7 angegeben; entsprechend dünnschichtchromatographischer Untersuchungen der einzelnen Fraktionen wurden solche gleicher Zusammensetzung vereinigt und adsorptiv über Kieselgel in Cyclohexan-Essigester (70 + 30) filtriert. Die dünnschichtchromatographisch ermittelte Zusammensetzung dieser Filtrate zeigt die Chromatogrammskizze Nr. 6.

Tabelle 7

Elemente	Auswaage	% (bezogen auf d. Gesamtauswaage)	Elemente	Auswaage	% (bezogen auf d. Gesamtauswaage)
0	68,8	2,33	13	190,0	6,43
1	66,8	2,26	14	190,0	6,43
2	66,8	2,25	15	161,0	5,43
3	67,6	2,28	16	103,8	3,52
4	71,8	2,43	17	73,6	2,45
5	104,0	3,53	18	141,3	4,83
6	107,6	3,64	19	65,6	2,22
7	124,2	4,22	20	49,8	1,59
8	151,0	5,13	21	62,4	2,12
9	168,9	5,73	22	36,0	1,23
10	192,6	6,53	23	36,2	1,24
11	270,2	9,16	24	26,3	0,90
12	287,8	9,76	25	69,9	2,36
insgesamt:				2953,7 *)	100,oo

*) Die Differenz zur Einwaage dürfte durch Lösungsmittelreste bedingt sein, die sich nur unvollständig aus den Rückständen der Elementphasen entfernen ließen.

Chromatogramm-Skizze 6
(Antimon-III-chlorid-Färbung)

Substanz	Element 0-5	Element 6-19	Element 20-24	TL-Färbung
Sterin II				bräunlich-violett
Sterin I				violett
				braun

DC-Versuchsbedingung : wie bei Chromatogramm-Skizze 5 (vgl. S. 23) angegeben.

Der Versuch zeigt, daß Sterin I und II bei dieser Craig-Verteilung zumindest teilweise abgetrennt werden konnten. Sterin I wurde hierbei in einer Ausbeute von 19 %, Sterin II in einer solchen von 14 % bezogen auf die Einwaage an unverseifbarem Anteil erhalten. Die Hauptmenge an Sterinen lag jedoch in den Elementen 6 - 19 immer noch als Gemisch vor. Außerdem war aufgefallen, daß Sterin I praktisch nur in der Petrolätherphase der Elemente 20 - 24 enthalten war, die entsprechenden Methanolphasen waren frei davon. Bei Sterin II lagen die Verhältnisse gerade umgekehrt, d.h. diese Substanz war praktisch nur in den Methanolphasen der Elemente 0 - 5 enthalten. Dieses Ergebnis läßt einen deutlichen Unterschied der beiden Sterine erwarten; Sterin I wird wesentlich liphophilere Eigenschaften besitzen als Sterin II. Das auf diese Weise abgetrennte Sterin I ließ sich aus Methanol kristallisieren, der Schmelzpunkt lag nach wiederholter Umkristallisation bei 136°C. Obwohl das in den Elementen 20 - 24 enthaltene Sterin II dünnschichtchromatographisch einheitlich zu sein schien, ließ es sich nicht kristallisieren.

Sterin III, das in geringer Menge im eingesetzten Material enthalten war (vgl. S. 23), konnte bei obiger Craig-Verteilung nicht mehr nachgewiesen werden; dies muß offenbar auf die adsorptive Filtration jeder einzelnen Fraktion über Kieselgel zurückgeführt werden, bei der sich dieses Sterin unter den genannten Bedingungen nicht mehr eluieren läßt. Einen Hinweis für diese Annahme mag der kleine R_f-Wert von Sterin III geben, der wesentlich niedriger als der von Sterin I und II ist, so daß Sterin III an Kieselgel ziemlich fest adsorbiert wird und infolgedessen bei einer adsorptiven Filtration quantitativ zurückgehalten wird.

Da nur eine begrenzte Drogenmenge zur Verfügung stand, war es notwendig, eine möglichst quantitative Trennung der beiden Sterine anzustreben. Bei obigem Versuch ließ sich nur ein relativ geringer Anteil an einheitlichen Sterinen aus dem unverseifbaren Anteil des KIGELIA-Öls abtrennen, so daß weitere Versuche dieser Art auszuführen waren. Es wurde deshalb untersucht, ob durch Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxid und Kieselgel eine vollständigere Trennung zu erreichen ist.

ß) Adsorptionschromatographie des unverseifbaren Anteils des KIGELIA-Öls:

Durch Adsorptionschromatographie des unverseifbaren Anteils (200 mg) an Aluminiumoxid (Säulenlänge : 50 cm; Durchmesser : 3 cm) unter Verwendung von Benzol-Chloroform (4 + 1) konnte bei fraktionierter Elution keine Trennung in der gewünschten Weise erreicht werden. Dünnschichtchromatographisch ließ sich zeigen, daß hierbei lediglich eine gewisse Verschiebung der Mengenverhältnisse der beiden Sterine zueinander eintritt, nicht jedoch eine Trennung.

Bei Verwendung von Kieselgel G an Stelle von Aluminiumoxid ließ sich durch fraktionierte Elution mit Benzol, Cyclohexan-Essigester (70 + 30) und Methanol entsprechend den in der Chromatogrammskizze 7 gemachten Angaben eine Sterinfraktion (Nr. 4 und 5) erhalten, die bei erneuter Chromatographie an Kieselgel (ohne Bindemittelzusatz) unter sonst gleichen Bedingungen zu einem ähnlichen Ergebnis führte wie die 26-stufige Craig-Verteilung (vgl. S. 24), nur mit einem wesentlichen Unterschied, daß Sterin II hierbei in kristallisierbarer Form erhalten wurde (vgl. S. 28 ; Chromatogrammskizze 8). Nach wiederholter Umkristallisation des Sterin II aus Methanol oder Äther zeigte Sterin II einen Schmelpunkt von 76°C.

Chromatogramm-Skizze 7
(Antimon-III-chlorid-Färbung)

Substanz	Fraktions-Nr.									TL-Färbung
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Sterin II										braun
Sterin I										violett
Sterin III										blau
Eluatmenge:	50 ml	50ml	50ml	100ml	100ml	300ml	50ml	150ml	150ml	
Elutions-mittel:	Benzol		Cyclohexan-Essigester (70+30)					Methanol		

DC-Versuchsbedingung: wie bei Chromatogrammskizze 5 (vgl. S. 23) angegeben.

Chromatogramm-Skizze 8

(Antimon-III-chlorid-Färbung)

Substanz	Fraktion												TL-Färbung
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Sterin II													braun
Sterin I													violett
Eluat-menge	50	50	50	50	50	50	50	50	50	350	100	100	(ml)
Elutions-mittel	Benzol			Cyclohexan-Essigester (70+30)						Methanol			

DC-Versuchsbedingung: wie bei Chromatogrammskizze 5 (vgl. S. 23) angegeben.

Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist das Auftreten von Sterin III in dem Methanoleluat (vgl. Chromatogrammskizze 7). Sterin III läßt sich demnach weder mit Benzol noch mit Cyclohexan-Essigester von der Säule eluieren, so daß es nicht weiter zu überraschen braucht, wenn bei der adsorptiven Filtration des unverseifbaren Anteils über Kieselgel bei Verwendung des gleichen Lösungsmittelgemisches Sterin III vollständig verschwindet (vgl. S. 26).

Da Sterin I und II sich aus Methanol gut kristallisieren lassen, war es naheliegend zu prüfen, ob durch direkte Behandlung des unverseifbaren Rückstandes mit heißem Methanol die Sterinfraktion abgetrennt werden kann und die Isolierung der beiden Sterine sich dadurch eventuell wesentlich vereinfachen ließe.

δ) Extraktion des unverseifbaren Anteils des KIGELIA-Öls mit Methanol:

Bei wiederholter Behandlung des unverseifbaren Anteils des KIGELIA-Öls mit heißem Methanol blieb eine in Methanol unlösliche, gummiartige braune Masse von eigenartigem Geruch zurück, die dünnschichtchromatographisch frei von Sterinen war.

Aus den Methanolextrakten schied sich beim Aufbewahren im Kühlschrank jeweils ein weißes kristallines Produkt mit einem Schmelzintervall von 120-124°C ab. Aus der Mutterlauge ließen sich nach dem Einengen weitere, jedoch mehr oder weniger braun verfärbte Kristalle abtrennen. Dünnschichtchromatographisch konnte gezeigt werden, daß in allen Kristallisaten die drei Sterine enthalten waren. Auf diese Weise lassen sich demnach die in dem unverseifbaren Anteil vorliegenden Sterine gut abtrennen. Die Ausbeute an Gesamtsterin beträgt im unverseifbaren Anteil etwa 19 %.

Der Einfachheit wegen wird im Rahmen dieser Arbeit das auf diese Weise gewinnbare Produkt als "Rohsterin" bezeichnet.

Der bei weitem überwiegende Anteil des unverseifbaren Rückstandes des KIGELIA-Öls besteht somit aus jener gummiartigen Masse, die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde, da sie keinerlei Tendenz zur Kristallisation aufwies und außerdem frei von Sterinen war.

Da der unverseifbare Anteil des KIGELIA-Öls (vgl. S. 22) und ebenso der Ölgehalt der Gesamtdroge (vgl. S. 12) bekannt ist, läßt sich nun der Gesamtsteringehalt im KIGELIA-Öl und in der Gesamtdroge angeben:

	Steringehalt:
KIGELIA-Öl :	1,71 %
Gesamtdroge:	0,09 %

Die Gesamtdroge enthält somit nur sehr geringe Mengen an Sterin, so daß ihre etwaige Verwendung als Ausgangsmaterial für Partialsynthesen wertvoller Steroidhormone schon aus diesem Grunde ohne Bedeutung bleiben wird.

f) Versuche zur Trennung des "Rohsterins" in die Einzelkomponenten:

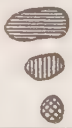
Versuche zur Trennung des "Rohsterins" durch fraktionierte Kristallisation aus Alkoholen verliefen ohne Erfolg.

Da sich das "Rohsterin" sublimieren ließ, und die Schmelzpunktdifferenz von Sterin I und II mit 60°C ziemlich groß ist, erschien eine Trennung durch fraktionierte Mikrosublimation immerhin im Bereich des Möglichen zu liegen. Außerdem bot sich hierfür wiederum die Adsorptionschromatographie an, mit deren Hilfe der unverseifbare Anteil des KIGELIA-Öls sich teilweise in die Einzelkomponenten hat zerlegen lassen.

α) Mikrosublimation des "Rohsterins":

Bei der fraktionierten Mikrosublimation des "Rohsterins" bei 0,15 Torr und einer allmählichen Temperatursteigerung bis 190° bahnte sich eine gewisse, wenn auch unvollständige Trennung der einzelnen Sterine an. Dünnschichtchromatographisch konnte gezeigt werden (s. Chromatogrammskizze 9), daß am Anfang ein überwiegend Sterin II enthaltendes Sublimatgemisch erhalten wird. Bei steigender Temperatur ändert das Sublimat seine relative Zusammensetzung in der Weise, daß dann Sterin I überwiegt, während in dem nicht sublimierten Rückstand praktisch nur Sterin I enthalten ist.

Chromatogrammskizze 9
(Antimon-III-chlorid-Färbung)

Sublimat bis 170°C	Sublimat bis 190°C	nicht sublimierter Anteil	
			Sterin II Sterin I Sterin III

DC-Bedingung: wie bei Chromatogrammskizze 5 angegeben (vgl. S. 23).

β) Adsorptionschromatographie des "Rohsterins":

Durch eine Reihe dünnschichtchromatographischer Vorversuche wurden zunächst nachstehende Lösungsmittelsysteme auf ihre Brauchbarkeit zur Trennung des "Rohsterins" in die Einzelkomponenten getestet:

1) Benzol
2) Benzol-Chloroform (4+6)
3) Benzol-Essigester (9+1)
4) Toluol-Essigester (9+1)
5) Cyclohexan
6) Cyclohexan-Essigester (7+3)
7) Cyclohexan-Essigester (85+15)
8) Tetrachlorkohlenstoff-Essigester
9) Chloroform
10) Methanol-Essigester

Für die Trennung der drei Sterine erwies sich das Fließmittel 3 als am besten geeignet.

Tabelle 8

Fließmittel	Sterin II	Sterin I	Sterin III
1) Benzol	0,99	0,83	0,81
2) Benzol-Chloroform (4+6)	0,81	0,78	0,76
3) Benzol-Essigester (9+1)	0,83	0,72	0,43
4) Toluol-Essigester (9+1)	0,79	0,64	0,60
5) Cyclohexan	0,82	0,59	0,52
6) Cyclohexan-Essigester (7+3)	0,73	0,58	0,48
7) Cyclohexan-Essigester (85+15)	0,70	0,42	0,39
8) Tetrachlorkohlenstoff-Essigester (7+3)	0,66	0,40	0,19
9) Chloroform	0,65	0,24	0,00
10) Methanol-Essigester (5+5)	0,43	0,13	0,12

Bei Verwendung des Fließmittels mit dem besten Trenneffekt als Elutionsflüssigkeit für eine Säulenchromatographie des "Rohsterins" an Kieselgel sollte sich ein annähernd gleicher Trenneffekt erreichen und damit die Trennung des "Rohsterins" in seine Einzelkomponenten verwirklichen lassen.

"Rohsterin" wurde deshalb an einer Kieselgelsäule (Kieselgel ohne Bindemittelzusatz, Länge 98 cm; Durchmesser 3 cm) mittels Benzol-Essigester (9+1) chromatographiert. Die fraktioniert abgenommenen Eluate wurden dünnschichtchromatographisch auf ihre Zusammensetzung hin untersucht und bei gleicher oder ähnlicher Zusammensetzung entsprechend vereinigt. Eine quantitative Trennung der drei Sterine war zwar nicht eingetreten, aber immerhin ein Teil an reinem kristallisierbaren Sterin I bzw. II ließ sich abtrennen. Aus den ebenfalls erhaltenen Mischfraktionen ließ sich durch erneute Chromatographie unter sonst gleichen Bedingungen ein weiterer Teil an reinen Sterinen gewinnen. Durch wiederholte Chromatographie der jeweils anfallenden Mischfraktionen gelang es schließlich, das Steringemisch praktisch quantitativ in seine Einzelkomponenten zu zerlegen. Durch Nachelution mit Methanol ließ sich schließlich auch Sterin III von den einzelnen Chromatographiesäulen eluieren und als Rohprodukt abtrennen.

In nachstehender Tabelle 9 sind die bei dieser Trennmethode aus 1,2 Gramm "Rohsterin" erhaltenen Mengen an Sterin I, II bzw. III angegeben, ebenso deren prozentualer Anteil im "Rohsterin" bezogen auf die Gesamtauswaage.

Tabelle 9

Bezeichnung	Auswaage	% Anteil im "Rohsterin"
Sterin I	840 mg	79,2 %
Sterin II	180 mg	16,9 %
Sterin III	41 mg	3,9 %
insgesamt	1061 mg	100,0 %
Einwaage	1200 mg	

In nachstehender Tabelle 10 ist abschließend der Gehalt der Gesamtdroge, des KIGELIA-Öls und des unverseifbaren Anteils an "Rohsterin", Sterin I, Sterin II und Sterin III zusammengestellt; die angegebenen Prozentwerte wurden aufgrund der bei der vorstehend beschriebenen Aufarbeitung der Droge jeweils erhaltenen und ausgewogenen Mengen errechnet:

Tabelle 10

	"Rohsterin"	Sterin I	Sterin II	Sterin III
Gesamtdroge	0,09 %	0,071 %	0,014 %	0,005 %
KIGELIA-Öl	1,71 %	1,35 %	0,27 %	0,08 %
Unverseifbarer Anteil	19,00 %	15,10 %	3,00 %	0,90 %
"Rohsterin"	-	79,50 %	15,80 %	4,70 %

C. Charakterisierung von Sterin I und II

Für die Charakterisierung der beiden Sterine wurden die aus dem unverseifbaren Anteil des KIGELIA-Öls isolierbaren Sterine in besonderer Weise gereinigt.

Eine Lösung von Sterin I in Chloroform wurde zunächst adsorptiv über Kieselgel filtriert, der Filtratrückstand wiederholt aus heißem Methanol umkristallisiert und das Kristallisat mikrosublimiert. Sterin II wurde in gleicher Weise gereinigt. Die beiden Sterine waren dann dünnschichtchromatographisch einheitlich.

Dünnschichtchromatographische Charakterisierung und Vergleich mit bekannten Sterinen

Sterin I und II wurden dünnschichtchromatographisch durch Verwendung von insgesamt 10 verschiedenen Fließmitteln durch ihre R_f-Werte charakterisiert. Gleichzeitig konnte durch einen Vergleich mit ß-Sitosterin, Stigmasterin, Ergosterin und Cholesterinacetat eine Identität mit diesen Sterinen ausgeschlossen werden. Die hierbei ermittelten R_f-Werte, sowie die im Spottest mit Phosphorsäure, Zimmermann-Reagenz und Liebermann-Burchard-Reagenz erhaltenen Farbreaktionen sind in der Tabelle 11 zusammengestellt:

Tabelle 11

Dünnschichtchromatographischer Vergleich von Sterin I und II mit bekannten Sterinen

		R_f-Werte (x 100)					
		Sterin I	Sterin II	ß-Sitosterin	Stigmasterin	Ergosterin	Cholesterinacetat
Fließmittel	1	83	99	83	83	83	100
	2	78	81	56	47	52	86
	3	72	83	64	64	60	96
	4	64	79	64	69	57	5
	5	59	82	49	50	22	100
	6	58	73	58	56	54	87
	7	42	70	46	60	48	4
	8	40	66	38	43	43	3
	9	24	65	25	25	7	22
	10	13	43	15	15	10	--
Färbung mit Antimon-III-chlorid	UV	orange	grün	-	-	grün	-
	TL	violett	violett-braun	violett	violett	violett	violett
Farbreaktionen (Spottest):							
Phosphorsäure	UV	blau	grün	orange	orange	orange	rosarot
Phosphormolybdänsäure	TL	blau	blau	blau	blau	blau	-
Zimmermann-Reagenz	TL	violett	braunviolett	-	-	-	-
Liebermann-Burckard-Reagenz	TL	rötlich	rötlich	rötlich	rötlich	rötlich	rötlich

DC-Versuchsbedingungen:

Kieselgel-G-Platten

Steighöhe	:	10 cm
Fließmittel 1	:	Chloroform-Aceton (9+1)
Fließmittel 2	:	Benzol-Essigester (6+3)
Fließmittel 3	:	Chloroform
Fließmittel 4	:	Chloroform-Cyclohexan (6+4)
Fließmittel 5	:	Chloroform-Benzol (6+4)
Fließmittel 6	:	Cyclohexan-Essigester (7+3)
Fließmittel 7	:	Toluol-Essigester (9+1)
Fließmittel 8	:	Benzol-Essigester (9+1)
Fließmittel 9	:	Cyclohexan-Chloroform (7+3)
Fließmittel 10	:	gesättigte Antimon-III-chlorid-lösung in Chloroform; nach dem Besprühen bei 110-120°C trocknen.

Farbreaktionen (Spottest):

Die zu testende Substanz wird in ätherischer Lösung punktförmig auf eine Kieselgel-G-Schicht aufgetragen und mit den jeweiligen Reagenzien in der angegebenen Weise behandelt.

Phosphorsäure: Besprühen mit 16 %iger Phosphorsäure. Trocknen bei 110°C ⟶ UV-Fluoreszenz.

Phosphormolybdänsäure: Besprühen mit 10 %iger Phosphormolybdänsäurelösung in Chloroform-Äthanol (1+1). Erwärmen auf 80 - 90°C, 5 Minuten lang. ⟶ Blaufärbung.

Zimmermann-Reagenz: Besprühen mit 2 %iger Lösung von m-Dinitrobenzol in absolutem Alkohol. Trocknen bei Raumtemperatur, dann Besprühen mit 2,5n methanolischer Kalilauge.
Erwärmen auf 70 - 100°C ⟶ Violettfärbung.

Liebermann-Burchard-Reagenz: Die zu testende Substanz wird in ätherischer Lösung punktförmig auf eine Gipsschicht aufgetragen, mit einer mit Acetanhydrid-Schwefelsäure angefeuchteten Glasplatte abgedeckt und 5 Minuten lang auf 110°C erhitzt ⟶ Rotfärbung.

Farbreaktionen (16):

Sterin I und II zeigten bei den Sterinfarbreaktionen nach SALKOWSKY, LIEBERMANN-BURCHARD, LIFSCHÜTZ, TSCHUGAEFF, ROSENHEIM, TORTELLI-JAFFE, ZIMMERMANN und PETTENKOFER unterschiedliche Reaktionen; die hierbei und vergleichsweise mit ß-Sitosterin, Stigmasterin, Ergosterin und Cholesterinacetat erhaltenen Färbungen sind in nachstehender Tabelle 12 wiedergegeben:

Tabelle 12

Reaktion nach:	Sterin I	Sterin II	ß-Sitosterin	Stigmasterin	Ergosterin	Cholest.-acetat
SALKOWSKY	-	-	rot	orange	tiefrot	blaurot ↓ purpurrot
LIEBERMANN-BURCHARD	blau ↓ grün	grün ↓ braun	violett ↓ blau	blau ↓ grün	blau ↓ grün	rosarot ↓ grün
LIFSCHÜTZ	hellblau	grünlich	grün ↓ blau	grün ↓ blau	gelb	grün ↓ blau
TSCHUGAEFF	orange+)	-	rötlich	orange+)	braun	eosinrot orange+)
ROSENHEIM	-	blaßgelb	-	blaßgrün	rot ↓ grün	-
TORTELLI-JAFFE	-	-	-	-	grün	-
ZIMMERMANN	violett	violett	violett	violett	braun violett	violett
PETTENKOFER	bläulich	gelblich	rosa ↓ blau	rötl. braun ↓ bläulich	rosa braun ↓ braun	rot ↓ blau

+) im UV-Licht

Anmerkung: Ausführung der Reaktion (Tabelle 12) s.S. 36 ff.

Schmelzpunkt und optische Aktivität:

Schmelzpunkt und optische Aktivität der beiden Sterine sind vergleichsweise in der Tabelle 13 zusammengestellt:

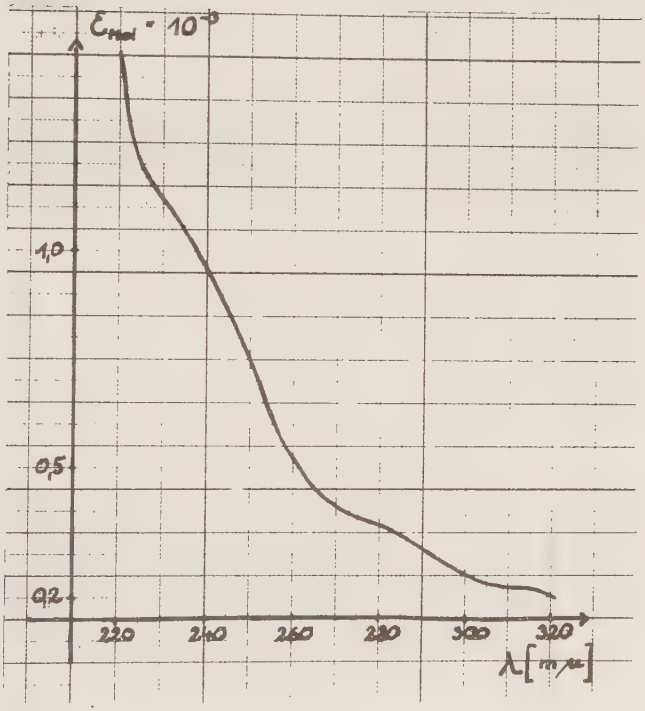
Tabelle 13

	Sterin I	Sterin II
Schmelzpunkt: umkristallisiert aus Methanol	136°C	76°C
umkristallisiert aus Benzol	136°C	116-8°C
Optische Aktivität: $[\alpha]_D^{20^\circ}$	-28°	+73,8°
C(g/100 ml)	1,25	0,325
Lösungsmittel	Chloroform	Chloroform

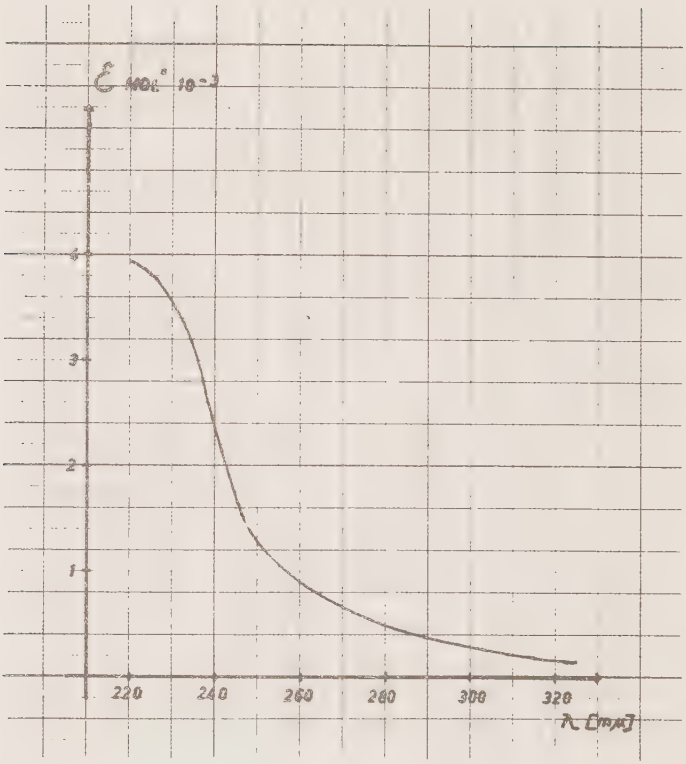
Auffallend war, daß Sterin II beim Umkristallisieren aus Benzol einen wesentlich höheren Schmelzpunkt aufwies als bei der Kristallisation aus Methanol. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß ein mikrosublimiertes "Benzol-Kristallisat" wieder den gleichen Schmelzpunkt wie ein "Methanol-Kristallisat" zeigte, so daß es sich hierbei möglicherweise um eine Verbindung mit Kristall-Benzol oder um eine Einschluß-Verbindung handelt, wie sie bei manchen Sterinen anzutreffen sind.

UV- und IR-Spektren:

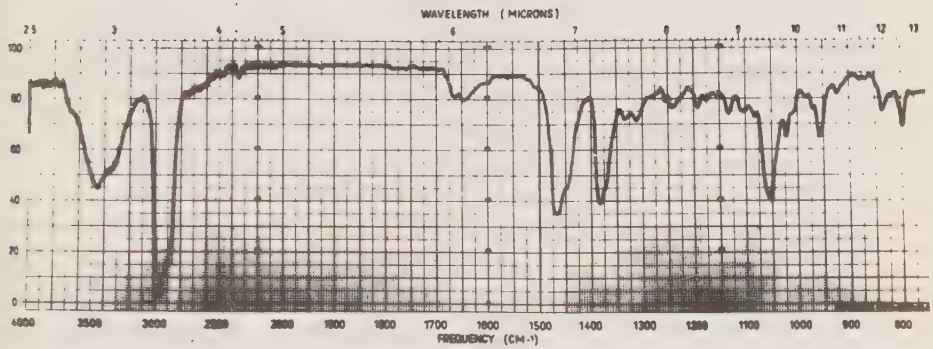
Die UV- und IR-Spektren der beiden Sterine sind nachstehend wiedergegeben:



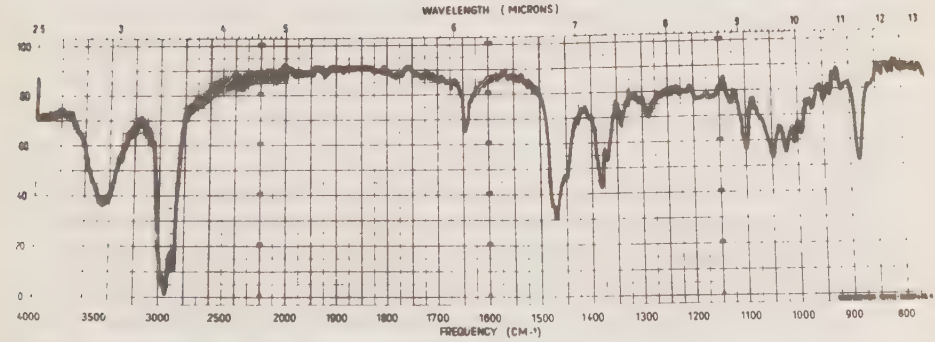
UV-Spektrum : Sterin I
(Lösungsmittel : Methanol-Äther 1+1)



UV Spektrum : Sterin II
(Lösungsmittel : Methanol-Äther 1+1)



IR-Spektrum von Sterin I



IR-Spektrum von Sterin II

Elementaranalyse und Strukturdiskussion von Sterin I:

Durch wiederholte Elementaranalyse und Molekulargewichtsbestimmung hat sich für Sterin I eine Summenformel von $C_{21}H_{36}O$ ergeben. Unter Berücksichtigung der IR-Banden bei 3460 cm^{-1} (OH-Valenzschwingung), 1055 cm^{-1} (C-O-Valenzschwingung) und der bei der Umsetzung von Sterin I mit Acetanhydrid, p-Nitrobenzoylchlorid erhaltenen Derivate (vgl. Tabelle 14) muß das Sauerstoffatom von Sterin I in Form einer Hydroxylgruppe vorliegen. Die genannten Derivate bestätigten ihrerseits die Summenformel von $C_{21}H_{36}O$ für Sterin I.

Tabelle 14

Derivate	Summenformel	F_p	R_f
Acetyl-Sterin I	$C_{21}H_{36}O+C_2H_2O$	122°C	0,36
p-Nitrobenzoyl-Sterin I	$C_{21}H_{36}O+C_7H_3NO_3$	180°C	0,62

DC-Versuchsbedingungen s. S. 23.

Da Sterin I sich bei Verwendung von Palladium-Kohle bzw. Raney-Nickel als Katalysator in verschiedenen Lösungsmitteln nicht hydrieren ließ und in unveränderter Form wiedergewonnen und außerdem in Tetrachlorkohlenstoff nicht bromiert werden konnte, darf angenommen werden, daß Sterin I gesättigter Natur ist. In gleicher Weise ist das UV-Spektrum zu interpretieren (17). UV-Spektren gesättigter Sterine zeigen einen ähnlichen Verlauf.

Für einen gesättigten Kohlenwasserstoff mit 21 Kohlenstoffatomen ergeben sich entsprechend der allgemeinen Formel C_nH_{2n+2} insgesamt 44 Wasserstoffatome, so daß bezüglich Sterin I eine Differenz von 8 Wasserstoffatomen resultiert, die nur als Ausdruck für 4 Ringbindungen oder 3 Ringbindungen und 1 Doppelbindung oder 2 Ringbindungen und 2 Doppelbindungen usw.

zu verstehen ist. Da Sterin I, wie bereits angedeutet, keine Doppelbindungen im Molekül enthalten dürfte, kann die Differenz von 8 Wasserstoffatomen nur 4 Ringbindungen zugeordnet werden, d.h. ein Ringsystem wie es den Sterinen allgemein in Form von Cyclopentanoperhydrophenanthren zu Grunde liegt, würde damit in Einklang stehen. Diese Annahme erfährt durch den positiven Verlauf verschiedener Sterinfarbreaktionen (vgl. S. 13, 15, 36) zumindest eine gewisse Bestätigung.

Der negative Verlauf der Farbreaktionen nach SALKOWSKY (18) und ROSENHEIM (19) ist mit der gesättigten Struktur von Sterin I vereinbar, da diese Farbreaktionen als weitgehend spezifisch anzusehen sind und nur bei Sterinen mit Dienstruktur oder bei solchen, die durch Dehydratisierung leicht konjugierte Doppelbindungen entstehen lassen, einen positiven Verlauf zeigen.

Die positive LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion, die charakteristisch für ungesättigte Sterinalkohole ist, erscheint deshalb in diesem Zusammenhang zunächst unverständlich, es sei denn, eine Dehydratisierung des Sterin I würde eintreten und die dabei entstehende Doppelbindung einer Halochromie unterliegen. Bei einer typisch positiven Liebermann-Burchard-Färbung, wie sie von BRIESKORN und HERRIG (20) beschrieben wird, kommt es zu einer Farbänderung von rot über violett nach grün, zu einer Änderung also, wie es bei Sterin I nicht beobachtet werden konnte (vgl. Tabelle 12), so daß dieses Ergebnis nicht unbedingt in Widerspruch zu einer gesättigten Struktur von Sterin I zu stehen braucht.

Die ZIMMERMANN-Reaktion ist zwar spezifisch für Ketosteroide, gibt aber auch mit gesättigten Sterinalkoholen eine Violettfärbung; die mit Sterin I erhältliche Färbung darf deshalb ebenfalls als Hinweis für seine gesättigte Sterinnatur gewertet werden. Die Farbreaktionen nach LIFSCHÜTZ und TSCHUGAEFF werden allgemein von Sterinalkoholen gegeben; Sterin I zeigt hierbei ebenfalls positive Farbreaktionen, so daß auch hier ein weiterer Hinweis für dessen Sterinnatur gegeben ist.

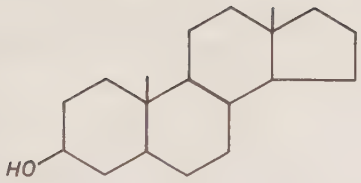
Einen weiteren Hinweis für die Sterinnatur von Sterin I gibt das IR-Spektrum. W. NEUDERT und H. RÖPKE (17) haben bei 900 Sterinen der verschiedensten Struktur stets starke Banden

in bestimmten Bereichen festgestellt und diese als Ausdruck für gesättigte Kohlenwasserstoffe, so z.B. für das Cyclopentanoperhydrophenantren-Ringsystem gewertet. In nachstehender Tabelle 15 wird gezeigt, daß Sterin I starke Banden in den von beiden Autoren definierten Bandenbereichen aufweist und deshalb zu den Sterinen gezählt werden kann.

Tabelle 15

Schwingungsart	Bandenbereich	Sterin I
Asymmetrische Valenzschwingung	2899-3106 cm^{-1}	2960 cm^{-1}
Symmetrische Valenzschwingung	2809-2899 cm^{-1}	2895 cm^{-1}
Asymmetrische Knick-(Deformations-) schwingung	1441-1475 cm^{-1}	1470 cm^{-1}
Symmetrische Knick- (Deformations-) schwingung	1333-1389 cm^{-1}	1385 cm^{-1}

Nach W. KARRER (21) besitzen alle bisher bekannt gewordenen Pflanzensterine eine Hydroxylgruppe in C_3-Stellung. L.F. FIESER und M. FIESER (22) stellen fest, daß fast alle Sterinalkohole dann mit Digitonin fällbar sind, wenn die Hydroxylgruppe am C_3-Atom in ß-Stellung sich befindet. Da Sterin I mit größter Wahrscheinlichkeit ein Sterinalkohol ist und außerdem mit Digitonin ein kristallines Fällungsprodukt bildet, darf angenommen werden, daß Sterin I über eine C_3-ständige Hydroxylgruppe in ß-Konfiguration verfügt. Alle in ihrer Struktur aufgeklärten Pflanzensterine haben anguläre Methylgruppen am C_{10}- und C_{13}-Atom. Unter der Voraussetzung, daß dies auch für Sterin I zutrifft, sind dann 19 der insgesamt 21 Kohlenstoffatome bekannt, so daß formal ein Rest von C_2H_5 verbleibt. Nachstehende Strukturformel dürfte dann die bisherigen Ergebnisse und Überlegungen zusammenfassend wiedergeben:



$C_{19}H_{31}O + C_2H_5$

Sterin I

Diese Struktur bedarf selbstverständlich einer Bestätigung durch verschiedene Abbaureaktionen, um das Steringerüst als solches, sowie die Stellung der Methylgruppen und der Hydroxylgruppe exakt zu beweisen. Untersuchungen dieser Art sind jedoch einer anderen Arbeit vorbehalten.

In der Literatur werden einige Sterine mit der Summenformel $C_{21}H_{36}O$ beschrieben. C. SOSA-BOURDOUIL und A. SOSA (23) isolierten aus dem Pollenstaub von CORYLUS avellana ein Sterin vom Schmelzpunkt 136,5°C und charakterisieren es als Acetylderivat, das bei 121,5°C schmilzt, jedoch soll das beschriebene Sterin ungesättigter Natur sein (Entfärbung von Brom; positive SALKOWSKY-Farbreaktion) und ist damit von Sterin I deutlich verschieden.

J. SCHREIBER et al. (24) erhalten durch Reaktion von 11-Keto-5α-pregnan mit Lithiumaluminiumhydrid ein Sterin mit der zur Diskussion stehenden Summenformel und dem Schmelzpunkt von 135°C, dem sie die Struktur eines 11-ß-Hydroxy-5α-pregnan zuordnen.

Diese Verbindung unterscheidet sich allerdings in ihrer spezifischen Drehung ($[\alpha]_D^{20}$ = +33,8°; Chlf.) sehr deutlich von der des Sterin I. Außerdem ist die IR-Bande für die OH-Valenzschwingung nach 3640^{-1} verschoben, so daß auch hier keine Identität mit Sterin I gegeben ist. W. NEUDERT und H. RÖPKE haben das IR-Spektrum von 5α-pregnan-3ß-ol aufgenommen,

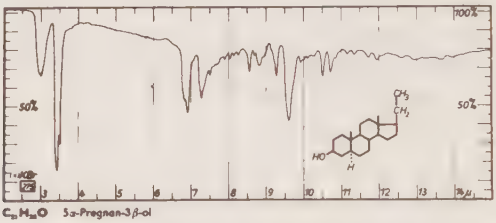
das einen weitgehend ähnlichen Bandenverlauf wie der des Sterin I aufweist und sich hauptsächlich nur durch geringe Bandenverschiebung unterscheidet. Auch der angegebene Schmelzpunkt von 136-138°C entspricht dem von Sterin I, allein in der spezifischen Drehung bestehen Unterschiede:

5α-Pregnan-3ß-ol : $[\alpha]_D^{20}$ = +17° (Chlf.)

Sterin I : $[\alpha]_D^{20}$ = -28° (Chlf.)

Unterschiede der zuletzt genannten Art könnten beispielsweise durch Konfigurationsunterschiede bedingt sein, so daß es sich bezüglich der Konstitution von Sterin I um ein Pregnan-Derivat handeln kann.

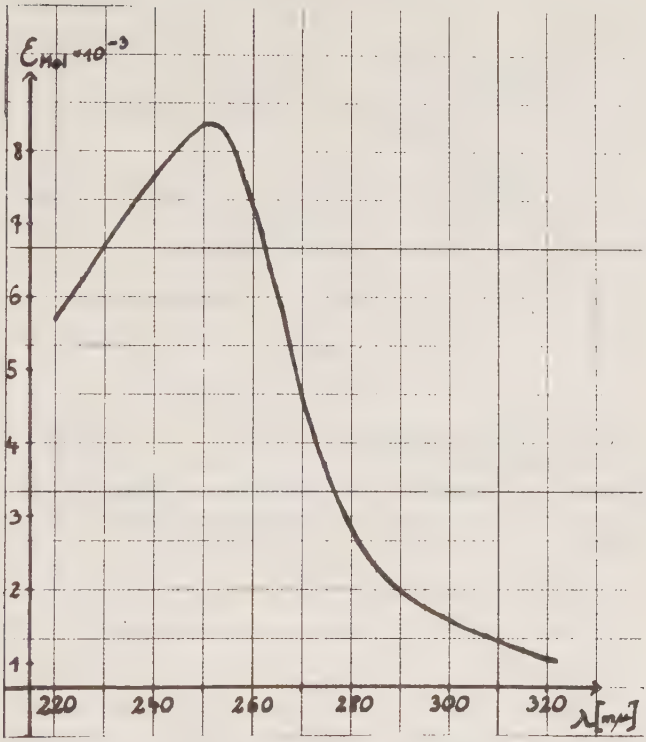
IR-Spektrum von 5α-Pregnan-3ß-ol

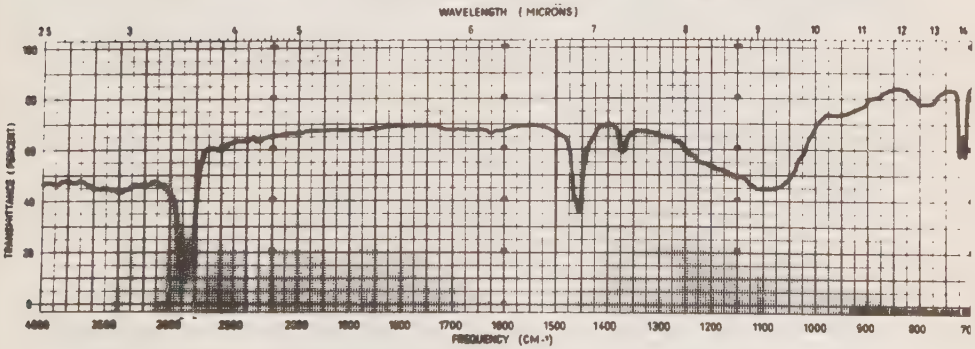


Da für Sterin I eine C_3-ständige Hydroxylgruppe wahrscheinlich gemacht werden konnte (vgl. S 44), sollte sich Sterin I als ein Sterin mit einer sekundären alkoholischen Gruppe nach der von E. MENNINI und J.K. NORYBERSKI (25) angegebenen Methode mit tertiär-Butylchromat zu dem entsprechenden Keton oxydieren lassen.

Versuche dieser Art führten zu einem kristallinen Produkt, das bei 166°C schmilzt und durch sein UV-Spektrum bzw. IR-Spektrum charakterisiert wurde.

UV-Spektrum des Oxydationsproduktes von Sterin I



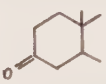
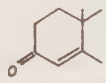
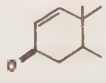


IR-Spektrum des Oxydationsproduktes von Sterin I

Die Elementaranalyse führte zu der Summenformel $C_{21}H_{32}O$ x 1/2 H_2O, wodurch erneut der C_{21}-Grundkörper bestätigt wurde. Dem IR-Spektrum ist unschwer zu entnehmen, daß an Stelle der für die Hydroxylgruppe charakteristischen Bande eine neue Bande bei 1675 cm^{-1} getreten ist. Diese Bande kann nach W. NEUDERT und H. RÖPKE nur Ausdruck für eine Karbonylgruppe sein, die in Konjugation mit einer Doppelbindung steht (vgl. nachstehende Tabelle 16).

Dieses Ergebnis steht auch mit der Elementaranalyse in Einklang, da Sterin I bei der Chromsäureoxydation nicht nur zwei, sondern vier Wasserstoffatome verliert.

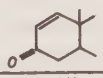
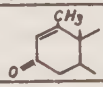
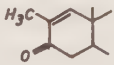
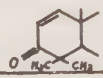
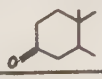
Tabelle 16

IR-Spektrum			
Konstitutionsmerkmale	Valenzschwingung	Bereich cm^{-1}	Sterin I cm^{-1}
	C = O	1695-1718	1675
	C = O C = C	1656-1684 1606-1623	1675 1594
	C = O C = C	1667-1684 1597-1611	1675 1594
alle konjugierten und unkonjugierten Ketone		1193-1302	1217 1239

Literaturmäßig kann allerdings kein Beispiel angeführt werden, das die Überführung eines gesättigten Sterinalkohols in ein α,β-ungesättigtes Keton mittels Chromsäureoxydation belegt, so daß obiges Resultat nur mit einem gewissen Vorbehalt gewertet werden darf. Erwähnt sei schließlich noch, daß der aus der Elementaranalyse errechnete Kristallwassergehalt des Oxydationsproduktes eine Bestätigung durch die hierfür charakteristische schwache und breite IR-Bande bei 3400 cm^{-1} fand.

Das UV-Spektrum muß wegen der hohen molaren Extinktion des Oxydationsproduktes (ε_{250} = 8400) auch als Hinweis für das Vorliegen eines α,β-ungesättigten Ketons gewertet werden, wenngleich hier gewisse Differenzen zu den von W. NEUDERT und H. RÖPKE (17) für ungesättigte Steroidketone gemachten Angaben bestehen (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17

Konjugiertes System	UV-Absorption α_{max}	ε (Methanol)
	240	16900
	250	15600
	229	10600
	241	13400
	239	10600
	230	10200
	220	1700
Oxydationsprodukt Sterin I	250	8400 *)

*) in Methanol-Aether (1+1)

Der Tabelle ist zu entnehmen, daß bei gesättigten Steroidketonen das Absorptionsmaximum außerhalb des normalen Meßbereiches (< 220 mμ) liegt und die molare Extinktion hier maximal ca. 1700 beträgt. Bei Steroidketonen mit konjugierter Doppelbindung wird das Absorptionsmaximum in den Meßbereich von 230 bis 250 mμ verschoben, wobei die molare Extinktion in Abhängigkeit von der Substitution auf einen Wert zwischen 10000 bis 16000 ansteigt. Ein Vergleich mit den spektralen Daten des Oxydationsproduktes von Sterin I zeigt, daß dieses auf keinen Fall ein gesättigtes Keton sein kann. Wenigstens größenordnungsmäßig ist es zu den ungesättigten Steroidketonen zu rechnen. Dies würde sich auch mit den IR-spektroskopischen Ergebnissen vereinbaren lassen. Die Lage des Absorptionsmaximums bei 250 mμ schließt ein unsubstituiertes Δ^1 bzw. Δ^4 ungesättigtes 3-Ketonsteroid weitgehend aus, so daß die bereits zur Diskussion gestellte Struktur eines Pregnan-3ß-ols zumindest fraglich erscheinen muß. Wie die Tabelle weiter erkennen läßt, bewirkt eine Methyl-Substitution der Doppelbindung einen deutlichen bathochromen Effekt, d.h. Verlagerung des Absorptionsmaximums in den längerwelligen UV-Spektralbereich bei gleichzeitiger Verminderung der molaren Extinktion. Hierbei ergibt sich dann eine gewisse Parallele zu dem Oxydationsprodukt von Sterin I, so daß nun hierfür ein Methyl- oder Äthyl-substituierter Ring A in Betracht gezogen werden sollte. Dies würde aber bedeuten, daß an Stelle eines Pregnan-Derivates ein methyl- oder äthyl-substituiertes Androstanderivat zur Diskussion gestellt werden muß.

Zur weiteren Charakterisierung des Oxydationsproduktes von Sterin I sei der dünnschichtchromatographische Vergleich mit dem Sterin I angeführt.

Tabelle 18

	Oxydationsprodukt	Sterin I
R_f	0,70	0,58
Antimon-III-chlorid-Färbung:		
UV-Licht	rötlich	orange
Tageslicht	rotorange	violett

DC-Versuchsbedingungen: wie Tabelle Nr. 5, S. 16.

Zusammenfassend sei nun festgestellt, daß in den Früchten von KIGELIA pinnata ein Sterin mit der Summenformel $C_{21}H_{36}O$ enthalten ist. Dieses Sterin ist gesättigter Natur und enthält eine Hydroxylgruppe, die sich verestern und in eine Ketogruppe überführen läßt. Ein Vergleich mit den IR- und UV-Spektren bekannter Sterine, sowie die Fällbarkeit mit Digitonin macht es wahrscheinlich, daß es sich hierbei um ein Pregnan-3ß-ol oder um ein methyliertes bzw. äthyliertes Androstan-3ß-ol-Derivat handelt.

Sterin I unterscheidet sich demnach von den übrigen Pflanzensterinen sehr wesentlich durch das Fehlen einer größeren Seitenkette am C_{17}-Atom. Das Vorkommen solcher Sterine im Pflanzenreich ist zwar nicht bekannt, jedoch sind Thelykinine in Form von Östron und Östriol in den verschiedensten Pflanzen und Pflanzenteilen nachgewiesen und daraus isoliert worden. Östron und Östriol unterscheiden sich von dem Androstanringsystem durch den aromatisierten Ring A, d.h. ein dem Androstan sehr ähnliches Ringsystem ließ sich im Pflanzenreich vorkommend nachweisen, so daß ein solches Ringsystem für Sterin I immerhin zur Diskussion gestellt werden kann.

Elementaranalyse und Strukturdiskussion von Sterin II:

Wegen des nur in geringer Menge zur Verfügung stehenden Sterin II war nur eine begrenzte Charakterisierung möglich. Durch Elementaranalyse hat sich die Summenformel $C_{25}H_{42-44}O$ ergeben, wobei das Heteroatom in Übereinstimmung mit dem IR-Spektrum (OH-Valenzschwingung 3460 cm^{-1}; C-O-Valenzschwingung = 1050 cm^{-1}) als Hydroxylgruppe vorliegend der Berechnung zugrunde gelegt wurde.

Die verschiedenen Farbreaktionen (vgl. S. 36) dürften in ähnlicher Weise wie für das Sterin I zu interpretieren und als Hinweis für die Sterinnatur anzusehen sein. Einen weiteren Hinweis für die Sterinnatur von Sterin II mag das IR-Spektrum geben. Sterin II besitzt in den von W. NEUDERT und H. RÖPKE (17) für das Steringrundgerüst angegebenen charakteristischen IR-Bandenbereichen starke Banden, wie nachstehende Tabelle erkennen läßt.

Tabelle 19

Schwingungsart	Bandenbereich	Sterin II
Asymmetrische Valenzschwingung	2899-3106 cm^{-1}	2950 cm^{-1}
Symmetrische Valenzschwingung	2809-2899 cm^{-1}	2880 cm^{-1}
Asymmetrische Knick-(Deformations-) schwingung	1441-1475 cm^{-1}	1470 cm^{-1}
Symmetrische Knick- (Deformations-) schwingung	1333-1389 cm^{-1}	1380 cm^{-1}

Für einen gesättigten Kohlenwasserstoff mit 25 Kohlenstoffatomen errechnen sich entsprechend der allgemeinen Formel C_nH_{2n+2} 52 Wasserstoffatome, so daß bezüglich Sterin II eine Differenz von 8 bzw. 10 Wasserstoffatomen resultiert. Dies kann nur als Ausdruck für 4 Ringbindungen bzw. 4 Ringbindungen und einer Doppelbindung verstanden werden, da sonst das Steringerüst in Form von Cyclopentanoperhydrophenanthren in Frage zu stellen wäre. Sterin II sollte im Hinblick auf die

IR-Bande bei 1650 cm^{-1} ungesättigter Natur sein, so daß der Summenformel $C_{25}H_{42}O$ der Vorzug zu geben wäre.

Auch das UV-Spektrum sollte wegen seiner deutlich höheren molaren Extinktion im Vergleich zu Sterin I in diesem Sinne gedeutet werden (vgl. S. 39).

Zusammenfassend sei festgestellt, daß das Vorkommen eines zweiten Pflanzensterins in den Früchten von KIGELIA pinnata sehr wahrscheinlich gemacht werden konnte. Dieses Sterin hat die Summenformel $C_{25}H_{42}O$, es sollte ungesättigter Natur sein und enthält eine Hydroxylgruppe, die α-ständig sein dürfte, da dieses Sterin zum Unterschied von Sterin I mit Digitonin sich nicht fällen ließ. Sterin II dürfte sich in seiner Struktur von Sterin I allein schon wegen der größeren Anzahl von Kohlenstoffatomen deutlich unterscheiden.

D) Versuche zum Nachweis der im verseifbaren Anteil des KIGELIA-Öls enthaltenen Fettsäuren

Zur Charakterisierung des in den Früchten von KIGELIA pinnata enthaltenen pflanzlichen Öls wurden zunächst die für Fette und Öle wichtigsten Kennzahlen, wie Verseifungszahl, Säurezahl, Jodzahl, Hydroxylzahl und der unverseifbare Rückstand bestimmt. Die gefundenen Werte zeigt nachstehende Tabelle.

Tabelle 20

Kennzahlen für KIGELIA-Öl

Verseifungszahl	180-212
Säurezahl	21
Jodzahl	120
Hydroxylzahl	20
Unverseifbarer Rückstand	6,6 %

Der bei der Gewinnung der Sterinfraktionen durch Verseifen des KIGELIA-Öls anfallende verseifbare Anteil wurde auf die darin vorkommenden Fettsäuren untersucht. Auf papierchromatographischem, dünnschichtchromatographischem und gaschromatographischem Wege wurde versucht, die hier vorliegenden Fettsäuren zu charakterisieren und gegebenenfalls zu identifizieren. Für die nachstehenden Versuche wurde das den verseifbaren Anteil des KIGELIA-Öls darstellende Fettsäuregemisch (= "KIGELIA-Fettsäuren") durch Umsetzen mit Diazomethan in ätherischer Lösung in das entsprechende Methylestergemisch übergeführt und jeweils weiterverarbeitet.

a) Papierchromatographische Untersuchung der "KIGELIA-Fettsäuren"

Eine Trennung der als Methylester vorliegenden "KIGELIA-Fettsäuren" wurde auf mit Undecan imprägniertem Papier unter Verwendung von mit Undecan-gesättigter 90 %iger Essigsäure bzw. Aceton-Wasser-Essigsäure (8,5+1,5+1,0) als Fließmittel

versucht. Die Anfärbung der Chromatogramme erfolgte nach der Kupferacetat/Kaliumferrocyanid-Methode (26).

Als Vergleichssubstanzen wurden die Methylester der Capron-, Capryl-, Caprin-, Laurin-, Palmitin-, Stearin-, Öl-, Linol- und Linolensäure hergestellt.

Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 21

Papierchromatographie von Fettsäuren in Form ihrer Methylester

Vergleichssubstanzen	Fließmittel I		Fließmittel II	
	Rf	KIGELIA-Fettsäuren Rf	Rf	KIGELIA-Fettsäuren Rf
Capronsäure Caprylsäure	1,0	-	1,0	1,0
Caprinsäure	0,58	0,58		
Laurinsäure	0,47	0,47		
Palmitinsäure	0,22	0,22	0,65	0,65
Stearinsäure Ölsäure Linolsäure Linolensäure	0,0	0,0	0,0	0,0

PC-Versuchsbedingungen:

Papier: S & S 2043 b
Imprägnierungsmittel : Undecan
Imprägnierungsgrad : I 0,19-0,28 g/g Papier
II 0,25 g/g Papier
Fließmittel : I Undecan-gesättigte 90 %ige Essigsäure
II Aceton-Wasser-Essigsäure (8,5+1,5+1)
Methode : I aufsteigend
II absteigend
Temperatur : 20°C

Die Tabelle 21 läßt bereits erkennen, daß in den "KIGELIA-Fettsäuren" Caprin-, Laurin-, und Palmitinsäure vorliegen sollten. Capron- und Caprylsäure dürften jedoch fehlen. Da Stearinsäure und die von ihr sich ableitenden ungesättigten Fettsäuren, wie Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure sich unter den genannten Bedingungen offenbar nicht trennen lassen, wurde eine Trennung der verschiedenen Methylester nach ihrer Überführung in die entsprechenden Hydroxamate auf acetyliertem Papier versucht. Als Fließmittel wurde Wasser-Tetrahydrofuran-Essigester (47+35+6) und Wasser-Aceton-Essigester (27+20+10) eingesetzt. Nach dem Chromatographieren wurden die Chromatogramme mit Eisen-III-chloridlösung angefärbt. Trotz Verwendung von imprägniertem Papier mit unterschiedlichem Acetylierungsgrad (25 % und 40 %) konnten entgegen den in der Literatur gemachten Angaben (27) keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden.

Die Hydroxamate der niedrigen Fettsäuren (C_6 bis C_{12}) waren nur auf Papier mit einem Acetylgehalt von 25 % zu trennen. Die Hydroxamate sämtlicher C_{18}-Säuren blieben stets am Start zurück. In dem Fettsäure-hydroxamat-gemisch konnten unter den zuletzt genannten Bedingungen die bereits wahrscheinlich gemachten niederen Fettsäuren (s.S. 55) papierchromatographisch allerdings nicht mehr nachgewiesen werden, so daß eine gegenseitige Beeinflussung der nur in geringer Menge in den "KIGELIA-Fettsäuren" vorhandenen niederen Fettsäuren und der mengenmäßig bei weitem überwiegenden höheren gesättigten und ungesättigten Fettsäuren angenommen werden muß. Da auf papierchromatographischem Wege sich keine eindeutigen Aussagen über das Vorliegen ungesättigter Fettsäuren machen ließen, wurden entsprechende Versuche dünnschichtchromatographischer Art durchgeführt.

b) Dünnschichtchromatographie von Fettsäuren als Methylester (2

Für die Trennung der als Methylester eingesetzten "KIGELIA-Fettsäuren" auf bei 110° aktivierten Kieselgel-G-Platten wurde eine Reihe verschiedener Fließmittel auf ihre Brauchbarkeit hin überprüft:

Fließmittel I : Petroläther-Benzol (95+5).
Fließmittel II : Chloroform-Eisessig (24+1).
Fließmittel III : Äther-Methanol (9+1).
Fließmittel IV : Äther-Benzol (1+1).
Fließmittel V : Petroläther-Äther-Eisessig (90+10+1).

Die Fettsäuremethylester ließen sich auf der Dünnschichtplatte dann mit Joddampf, 2′, 7′-Dichlorfluoresceinlösung, Rhodamin-B-Lösung und Chromschwefelsäure nachweisen.

Joddampf läßt ungesättigte Fettsäureester als braune Flekken auf hellem Grund sichtbar werden, gesättigte Fettsäureester dagegen als hellbraune Flecken.

Nach Behandlung mit 2′, 7′-Dichlorfluoresceinlösung sind nahezu alle Fettsäuremethylester im UV-Licht als hellgrün fluoreszierende Flecken auf dunklem Grund zu erkennen.

Nach Rhodamin-B-Behandlung erscheinen die Fettsäuremethylester als tiefviolette Flecken auf rosarotem Grund.

Chromschwefelsäure führt nach Wärmebehandlung der Dünnschichtchromatogramme zu einer Grau- bzw. Schwarzfärbung.

Trotz Variierung der Versuchsbedingungen gelang es nicht, die Fettsäuremethylester als Gemisch einwandfrei zu trennen. Die Reinsubstanzen liessen sich zwar durch ihren R_f-Wert charakterisieren, im Gemisch waren die Unterschiede jedoch zu gering, als daß eindeutige Aussagen hätten gemacht werden können.

Bekanntlich können bestimmte gesättigte und ungesättigte Fettsäuren je nach chromatographischen Versuchsbedingungen sogenannte "kritische Paare" bilden und erscheinen dann nur in Form eines Fleckens. So lassen sich beispielsweise Methyloleat und Methylpalmitat bzw. Methyllinoleat und Methylmyristat dünnschichtchromatographisch nicht trennen.

Ähnliche Verhältnisse können in dem "KIGELIA-Fettsäuregemisch" und ähnlichen Modellmischungen vorgelegen haben, so daß es nicht weiter zu überraschen braucht, wenn eine entsprechende Trennung ausblieb.

Da das Vorkommen einiger bekannter Fettsäuren in den "KIGELIA-Fettsäuren" wahrscheinlich gemacht werden konnte, war für einen exakten Nachweis jedoch deren Isolierung notwendig.

c) Versuche zur Isolierung und Identifizierung der in den "KIGELIA-Fettsäuren" vorliegenden Einzelkomponenten

Zur Isolierung der Einzelkomponenten eines Fettsäuregemisches, wie es in Form der "KIGELIA-Fettsäuren" vorliegt, bot sich zunächst eine Vortrennung durch Kältefraktionierung an, die zumindest eine gewisse Trennung der gesättigten von den ungesättigten Fettsäuren ermöglicht. Durch fraktionierte Destillation und Kristallisation sollte sich ebenfalls eine Trennung erreichen lassen.

α) Kältefraktionierung der "KIGELIA-Fettsäuren"

Die Hauptmenge der gesättigten Fettsäuremethylester ließen sich in der Weise abtrennen, daß die als Methylester vorliegenden "KIGELIA-Fettsäuren" in Aceton (2 g Ester in 5 ml Aceton) gelöst und bei -20°C aufbewahrt wurden. Die hierbei sich abscheidenden gesättigten Fettsäureester wurden in der Kälte abgetrennt; ihr Anteil an den "KIGELIA-Fettsäuren" war nur gering und betrug nach dieser Methode nur ca. 4 % der Einwaage. Die Trennung dürfte im Hinblick auf die Jodzahl (vgl. S. 54) recht unvollständig verlaufen sein, so daß eine Weiterverarbeitung der auf diese Weise erhaltenen gesättigten bzw. ungesättigten "KIGELIA-Fettsäuren" wenig sinnvoll erschien. Es wurden deshalb die "KIGELIA-Fettsäure-Methylester" ohne Vortrennung direkt einer fraktionierten Destillation unterworfen.

β) Fraktionierte Destillation der "KIGELIA-Fettsäuren"

Die "KIGELIA-Fettsäuren" wurden in Form ihrer Methylester im Vakuum bei 0,4 Torr fraktioniert destilliert. Die erhaltenen Fraktionen wurden beim Aufbewahren bei -20°C kristallin, bei Raumtemperatur blieben sie dann teils kristallin, teils wurden sie wieder flüssig. Die Tabelle 22 zeigt die Fraktionierungsdaten; etwa 20 % der eingesetzten Estermenge hatten sich unter diesen Bedingungen offenbar zersetzt und blieben als nicht destillierbare, dunkelbraune zähe Masse zurück.

Tabelle 22

Fraktionierte Destillation der "KIGELIA-Fettsäuren" in Form ihrer Methylester

Fraktion	$Kp_{0,4}$	% Ausbeute; bezogen auf Gesamteinwaage
1	bis 110°C	10,6 %
2	111-140°C	12,6 %
3	141-148°C	30,0 %
4	149-151°C	17,3 %
5	152-153°C	8,0 %
6	über 153°C	1,9 %

Eine weitere Reinigung der bei der Destillation erhaltenen Fraktionen bestand darin, die auf -20°C gekühlte Fraktion auf vorgekühlte Tonteller zu verteilen und so lange mit kaltem Methanol zu beträufeln, bis nur mehr weiß glänzende Kristalle auf dem Tonteller zurückblieben (Tontellerkristallisat).

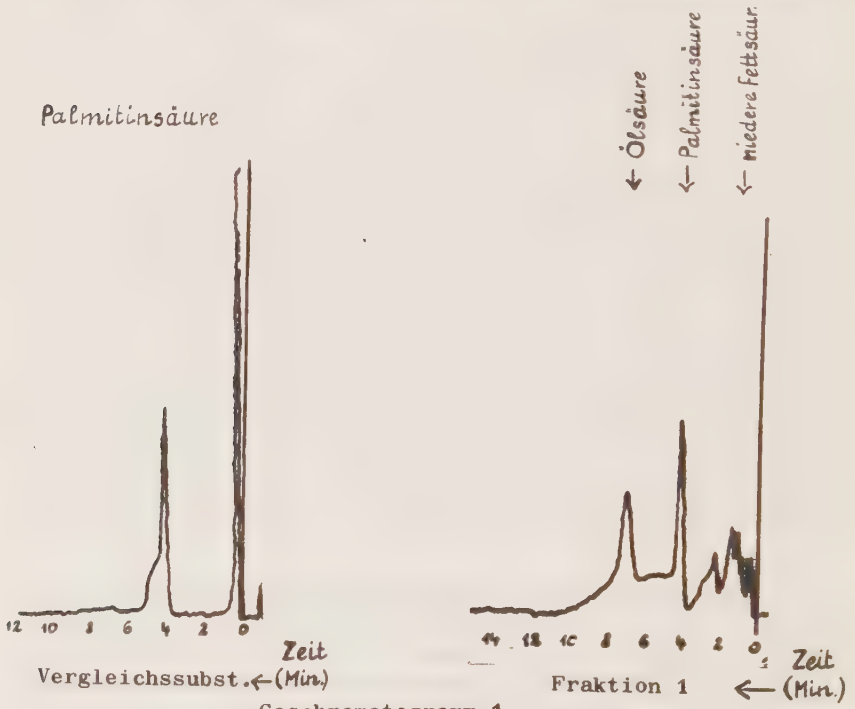
Aus Fraktion 1 und 2 konnte auf diese Weise eine bei 26 bis 28,5°C schmelzende kristalline Verbindung abgetrennt werden, die dünnschichtchromatographisch mit authentischem Palmitinsäuremethylester (F_p = 29°C) identisch war. Elementaranalyse und Mischschmelzpunkt bestätigten dieses Ergebnis. Palmitinsäure ist somit Bestandteil der "KIGELIA-Fettsäuren" und liegt demnach auch im KIGELIA-Öl in gebundener Form vor.

Aus Fraktion 3 wurde nach der Tontellermethode eine bei 26°C schmelzende, dünnschichtchromatographisch einheitliche Verbindung erhalten, deren Elementaranalyse das Vorliegen einer ungesättigten C_{16}-Säure wahrscheinlich macht. Es könnte sich hier um die Palmitolein- oder Palmitlinolsäure handeln.

Fraktion 4,5 und 6 zeigten ein ziemlich gleichartiges Verhalten. Nach der Tontellermethode wurde jeweils ein bei 33 bis 36°C schmelzendes kristallines Produkt erhalten, das beim Mischschmelzpunkt mit authentischem Stearinsäuremethylester (F_p = 35 - 38°C) zu keiner Depression führte. Durch Elementaranalyse ließ sich dieses Ergebnis zusätzlich bestätigen.

Da nur nach der Tontellermethode kristalline Substanzen aus den einzelnen Fraktionen zu erhalten waren, mußte angenommen werden, daß durch die Behandlung mit Methanol sich Verunreinigungen entfernen ließen, die eine direkte Kristallisation der einzelnen Fraktionen verhinderten. Inwieweit es sich bei diesen "Verunreinigungen" um Fettsäureester handelte, sollte sich gaschromatographisch nachweisen lassen.

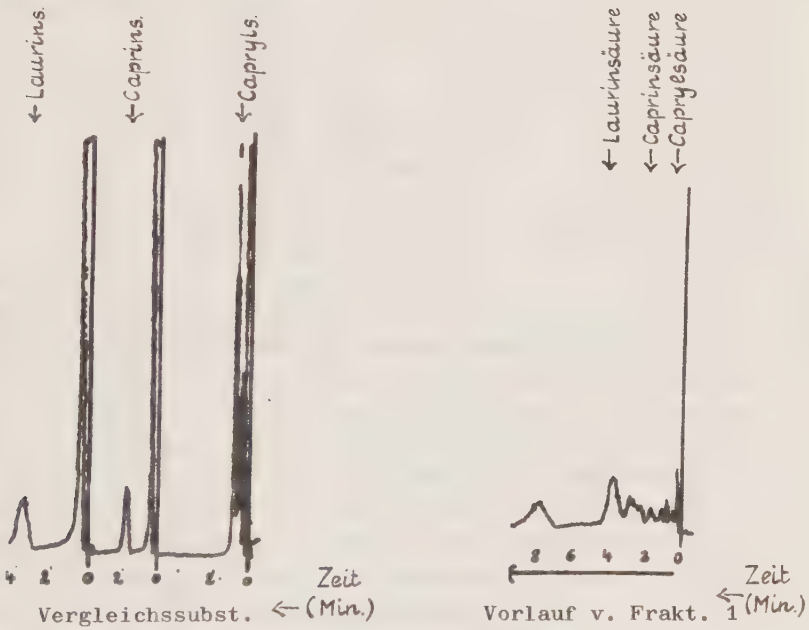
So ließ sich in Fraktion 1 neben Palmitinsäure nun noch Ölsäuremethylester nachweisen. Die Retentionszeiten waren mit authentischen Materialien identisch (vgl. Gaschromatogramm 1).



Gaschromatogramm 1

Fettsäuren als Methylester

Die zahlreichen kleineren peaks vor dem Palmitinsäurepeak konnten Ausdruck für niedere Fettsäuremethylester sein. In einem gesonderten Versuch wurde die Fraktion 1 erneut fraktioniert und der niedrig-siedende Vorlauf gaschromatographiert. Hierbei ließ sich im Vergleich mit Capron-, Capryl-, Caprin- und Laurinsäuremethylester jetzt eindeutig nachweisen, daß all diese Methylester mit Ausnahme des Capronsäuremethylester in der ursprünglichen Fraktion 1 enthalten sind (vgl. Gaschromatogramm 2).



Gaschromatogramm 2
Fettsäuren als Methylester

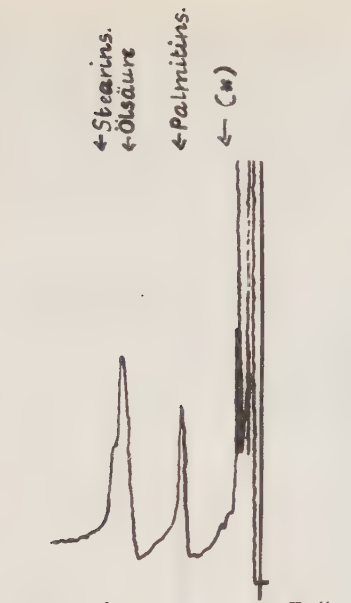
Gaschromatographisch enthält Fraktion 2 neben geringen Mengen Stearinsäure- und Ölsäuremethylester im wesentlichen nur Palmitinsäuremethylester (vgl. Gaschromatogramm 3).

Fraktion 2

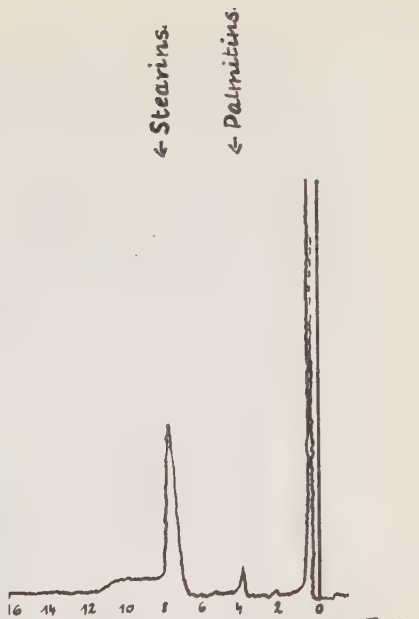
Gaschromatogramm 3

In Fraktion 3 ließ sich gaschromatographisch neben Ölsäure-, Palmitinsäuremethylester und geringen Mengen Stearinsäuremethylester eine Verbindung (*) nachweisen, bei der es sich um jenen mehr oder weniger ungesättigten Palmitinsäuremethylester handeln könnte. Die Retentionszeit des Methylesters einer gesättigten Fettsäure wird dann kleiner, wenn bei gleicher Kohlenstoffanzahl diese Fettsäure eine Doppelbindung aufweist (z.B. Stearinsäure ⟶ Öl-säure). Es ist auffallend, daß die Retentionszeit des unbekannten peaks (*) deutlich kleiner ist als die des Palmitinsäuremethylesters, so daß es sich hierbei um den Palmitolein- bzw. Palmitlinolsäuremethylester handeln könnte (vgl. Gaschromatogramm 4).

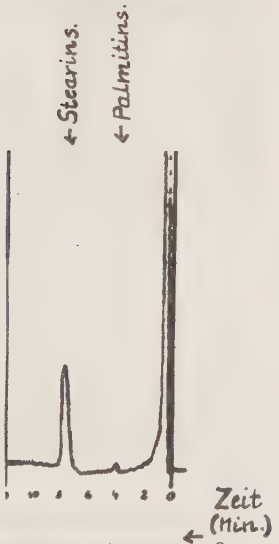
Fraktion 4 und 5 enthalten gaschromatographisch praktisch nur den Stearinsäuremethylester. Diese Fraktionen sind nur geringfügig durch den Palmitinsäuremethylester verunreinigt (vgl. Gaschromatogramm 5 und 6).



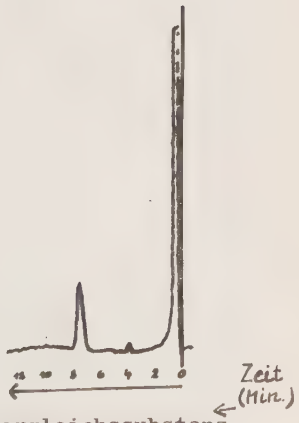
Gaschromatogramm 4



Gaschromatogramm 5



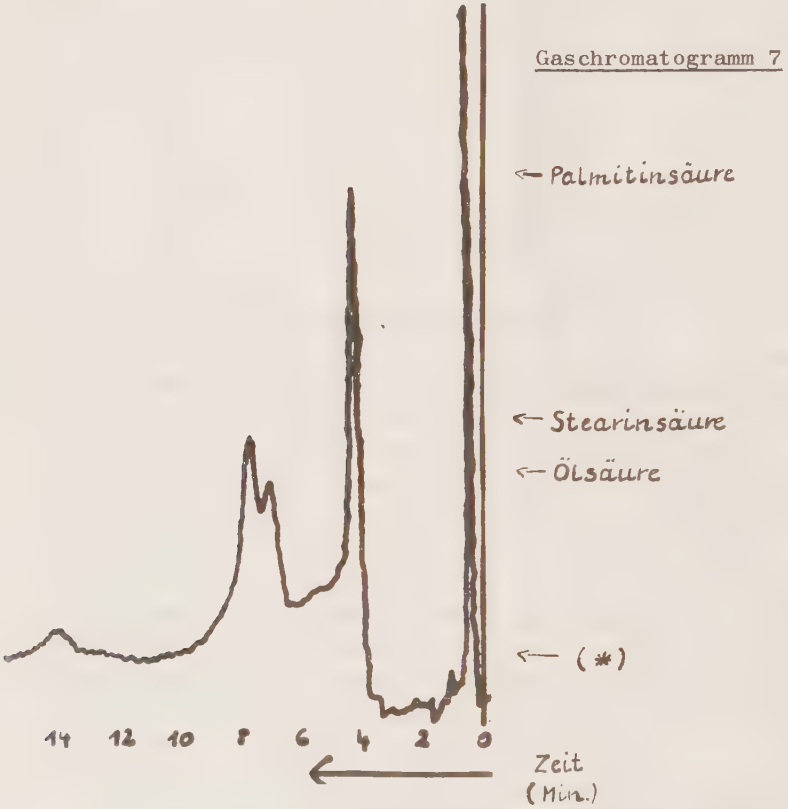
Gaschromatogramm 6



Vergleichssubstanz

Fettsäuren als Methylester

Das "Gaschromatogramm 7" der "KIGELIA-Fettsäure-Methylester" soll lediglich zeigen, daß Palmitin-, Stearin- und Ölsäuremethylester den Hauptanteil dieses Gemisches ausmachen. Das Vorhandensein von niederen gesättigten Fettsäuremethylestern (C_8 bis C_{14}) wird überhaupt nicht mehr oder nur noch durch sehr kleine peaks angedeutet.



Die Gaschromatogramme der dünnschichtchromatographisch reinen Palmitin-, Stearin- und Ölsäuremethylester sind obigen Gaschromatogrammen zum Vergleich gegenübergestellt.

An Hand von einigen gaschromatographischen Versuchen mit ungesättigten Fettsäuremethylestern hatte sich zeigen lassen, daß Verbindungen dieser Art während des Gaschromatographierens bei

220°C bereits merklich verändert werden, so daß eine richtige Zuordnung der peaks erschwert wird. Diese Veränderungen zeigten sich vor allem an dem Auftreten breiter peaks im Gaschromatogramm, die andere peaks in diesem Bereich überdecken konnten.

Es war deshalb auf diese Weise nicht mit Sicherheit nachzuweisen, ob auch mehrfach ungesättigte Fettsäuremethylester vorlagen. Wahrscheinlich dürfte in den "KIGELIA-Fettsäuren" neben Ölsäure auch Linol- und Linolensäure enthalten sein. Es war deshalb erforderlich, speziell die ungesättigten Fettsäuren nach der von H. WAGNER und P. POHL (29) angegebenen Methode über ihre Quecksilberacetat-Addukte abzutrennen und dünnschichtchromatographisch zu identifizieren.

Zusammenfassend sei festgestellt, daß mit Hilfe der Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie und Gaschromatographie das Vorhandensein der Capryl-, Caprin-, Laurin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure in den "KIGELIA-Fettsäuren" nachgewiesen werden konnte. Palmitinsäure- und Stearinsäuremethylester ließen sich außerdem kristallin abtrennen und ihre Identität sowohl durch Mischschmelzpunkt mit authentischem Material als auch durch Elementaranalyse nachweisen.

Die genannten Säuren sind somit, wenn auch in gebundener Form, Bestandteile des "KIGELIA-Öls".

Möglicherweise sind aber auch Linol- und Linolensäure darin enthalten.

δ) Nachweis und Isolierung "ungesättigter KIGELIA-Fettsäuren"

Wie bereits angedeutet, sollten sich speziell die ungesättigten Fettsäuren aus den "KIGELIA-Fettsäuren" nach der von H. WAGNER und P. POHL (29) angegebenen Methode über ihre Quecksilber-Addukte abtrennen und dann identifizieren lassen.

Da die Quecksilberacetat-Addukte der freien ungesättigten Fettsäuren sich dünnschichtchromatographisch nicht so gut trennen lassen wie ihre Methylester, wurden für diesen Versuch wiederum die "KIGELIA-Fettsäuren" in Form ihrer Methylester eingesetzt. Zunächst wurden die gesättigten Fettsäuremethylester von den ungesättigten in der Weise abgetrennt, daß die ein Quecksilberacetat-Addukt bildenden ungesättigten Fettsäuremethylester durch eine 26-stufige Craig-Verteilung in dem System Methanol-Petroläther von den gesättigten Fettsäuremethylester abgetrennt werden.

Die Quecksilberacetat-Addukte verblieben dabei ihrer guten Methanollöslichkeit wegen in den Elementen 0 bis 7; die kein Addukt bildenden gesättigten Fettsäureester lagen ihrer guten Petrolätherlöslichkeit wegen in den Elementen 21 bis 25 vor.

Die in den Methanolphasen der Elemente 0 bis 7 enthaltenen Addukte ließen sich durch Behandlung mit kalter Salzsäure wieder zerlegen, und die dabei frei gewordenen Fettsäureester mit Petrolätherabtrennen. Diese Petrolätherlösungen, sowie die die gesättigten Fettsäureester enthaltenden Petrolätherphasen wurden vom Lösungsmittel befreit; die hierbei verbleibenden Rückstände sind Ausdruck für das Mengenverhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren in den "KIGELIA-Fettsäuren". Die nachstehenden Angaben beziehen sich auf die Gesamtauswaage.

Gesättigte Fettsäuremethylester : 18 %
Ungesättigte Fettsäuremethylester: 82 %

Das Ergebnis dieser Trennung zeigt deutlich den Vorteil dieser Methode gegenüber der Kältefraktionierung, bei der nur 4 % gesättigte Fettsäuremethylester abgetrennt werden konnten.

Ein dünnschichtchromatographischer Vergleich der auf diese Weise angereicherten ungesättigten Fettsäuremethylester mit den Methylestern der Öl-, Linol- und Linolensäuremethylester ermöglichte keine eindeutige Zuordnung, da die im Gemisch vorliegenden ungesättigten Fettsäureester sich offenbar gegenseitig so sehr beeinflussen, daß im Vergleich mit den authentischen Estern davon völlig verschiedene R_f-Werte resultieren.

Es wurde deshalb versucht, die Quecksilber-acetat-Addukte als solche zu chromatographieren und zwar im Vergleich mit den Addukten des Ölsäure-, Linol- und Linolensäuremethylesters.

Die Quecksilber-acetat-Addukte ließen sich auf Kieselgel-Kieselgur unter Verwendung von Isobutanol-Ameisensäure-Wasser (100 + 0,5 + 15,7) dünnschichtchromatographisch gut trennen. Das Ergebnis zeigt nachstehende Chromatogrammskizze:

Chromatogrammskizze 10

Dünnschichtchromatographie der Quecksilber-acetat-Addukte ungesättigter Fettsäureester

	R_f (gef.)	R_f (Lit.)	Färbung
A	0,81	0,82-0,91	blauviolett
B	0,74	0,73	rotviolett
C	0,66	0,66	blauviolett
	0,55	0,54	blauviolett
6			

DC-Bedingungen:
Kieselgel-Kieselgur (3 + 7)-Platten, bei 55°C aktiviert.
Fließmittel : Isobutanol-Ameisensäure-Wasser (100+0,5+15,7).
Laufzeit : 6 Std.
Sprühreagenz : 2 % Diphenylcarbazon in Isobutanol.

1) : Ölsäure
2) : Linolsäure
3) : Palmitlinolsäure
4) : Linolensäure
5) : ungesättigte KIGELIA-Fettsäuren
6) : Fleckenbezeichnung (Fraktion)

Methylester als Addukte

Obige Chromatogrammskizze zeigt nun, daß Ölsäure und Linolsäure und wahrscheinlich auch Linolensäure Bestandteile der ungesättigten KIGELIA-Fettsäuren sind. Da der R_f-Wert einer Verbindung häufig von anderen Begleitstoffen ähnlicher Struktur merklich beeinflußt werden kann, war für einen eindeutigen Beweis die erneute Chromatographie der den einzelnen Flecken entsprechenden Komponenten notwendig. Zu diesem Zweck wurde die jeweilige Kieselgel-Kieselgurschicht abgetrennt und die darin enthaltenen Fettsäuremethylester nach der von GLASER und GRIMMER angegebenen Methode (30) durch Behandlung mit Ammoniumrhodanid/Salzsäure regeneriert und mit Petroläther extrahiert. Die hierbei erhaltenen Fraktionen A, B und C wurden anschließend auf mit Paraffinöl-imprägnierten Kieselgur-Platten dünnschichtchromatographisch mit den Methylestern der Öl-, Linol- und Linolensäure verglichen. Das Ergebnis zeigt folgende Tabelle 23.

Tabelle 23

Dünnschichtchromatographie ungesättigter Fettsäuremethylester

Vergleichssubstanzen	R_f	R_f		
		Fraktion A	Fraktion B	Fraktion C
Ölsäuremethylester	0,35	0,36		
Linolsäuremethylester	0,65		0,64	
Linolensäuremethylest.	0,74			0,74
Ölsäuremethylester	0,81	0,81		

DC-Bedingungen:
Kieselgurplatten: aktiviert bei 120°C
Imprägnierungsmittel: Paraffinöl-Petroläther (1+9)
Fließmittel: Ameisensäure-Acetonitril-Aceton (2+2+1)
Laufzeit: 1 Stunde
Farbreagenz: Osmiumtetraoxid (gasförmig)

Die Tabelle 23 läßt erkennen, daß Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure Bestandteile der "KIGELIA-Fettsäuren" sind.

Bemerkenswert bleibt in diesem Zusammenhang das Auftreten von zwei Flecken bei der Ölsäure. Obwohl Ölsäure als Quecksilberacetat-Addukt einheitlich zu sein scheint, d.h. dünnschichtchromatographisch nur zu einem Flecken führt, werden nach dem Regenerieren stets zwei Flecken erhalten. Der Chromatogrammflecken mit dem R_f-Wert von 0,81 muß im Zusammenhang mit der Imprägnierung stehen, da an Hand von verschiedenen Versuchen gezeigt werden konnte, daß dieser Flecken dann nur mehr ganz schwach auftritt, wenn die imprägnierte Kieselgurschicht wiederholt in verschiedenen Laufrichtungen mit dem angegebenen Fließmittel gewaschen wird. Bei anschließendem Chromatographieren quer zur Laufrichtung des Imprägnierungsfließmittels wird bei Ölsäure dann praktisch nur mehr ein Chromatogrammflecken erhalten. Die von GLASER und GRIMMER angegebene Spaltung der auf dem Dünnschichtchromatogramm mit Diphenylcarbazon angefärbten Quecksilber-acetat-Addukte gestattet außerdem, quantitative Aussagen über die betreffenden ungesättigten Fettsäureester zu machen. Auf mehreren Kieselgel-Kieselgur-Platten wurde deshalb eine bestimmte Menge ungesättigter "KIGELIA-Fettsäure-Methylester" in Form des Quecksilber-accetat-Adduktes aufgetragen und entsprechend den bei Chromatogrammskizze 10 gemachten Angaben dünnschichtchromatographisch getrennt.

Nach dem Regenerieren der ungesättigten Fettsäuremethylester aus dem jeweiligen Fleckenmaterial ergab sich für die ungesättigten KIGELIA-Fettsäuren folgende prozentuale Zusammensetzung:

Ölsäuremethylester	: 650 mg	(entsprechend 63,4 %)
Linolsäuremethylester	: 34 mg	(entsprechend 3,3 %)
Linolensäuremethylester	: 342 mg	(entsprechend 33,3 %)

Die auf diese Weise isolierten ungesättigten Fettsäureester wurden in Tetrahydrofuran in Gegenwart von Raney-Nickel hydriert. Bei dem Linolensäuremethylester mußte auf 50° C erwärmt werden, um eine vollständige Hydrierung zu erreichen. In jedem Fall konnte nach der Hydrierung ein kristallines Pro-

dukt vom Schmelzpunkt 35°C erhalten werden, das mit dem Stearinsäuremethylester identisch war, da der Mischschmelzpunkt zu keiner Depression führte. Damit kann das Vorliegen dieser drei ungesättigten Fettsäuren in den KIGELIA-Fettsäuren als bewiesen angesehen werden.

Zusammenfassend sei nun festgestellt, daß sich in dem KIGELIA-Öl neben kleineren Mengen Capryl-, Caprin- und Laurinsäure hauptsächlich Stearinsäure, Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure haben nachweisen lassen, und damit in gebundener Form Bestandteile des KIGELIA-Öls sind.

E) Pharmakologische Untersuchung

I. Tierexperimentelle Untersuchungen mit Sterin I und II:

Wie bereits eingangs erwähnt, wird KIGELIA pinnata volksmedizinisch vor allem als Antirheumaticum und Antiphlogisticum verwendet. Nach der Isolierung von Sterin I und II war es naheliegend, diese mit der entzündungshemmenden und eventuell auch antirheumatischen Wirkung der Droge in Verbindung zu bringen. Es wurde deshalb untersucht, ob sich tierexperimentell mit Hilfe des Granulomtaschen-Testes und des Rattenpfotenoedem-Testes eine solche Wirkung für Sterin I und II nachweisen läßt.

a) Granulomtaschen-Test an der Ratte:

Bei diesem Test (31) wird im Unterhautgewebe eine künstliche Höhle geschaffen, in die man ein lokal reizendes Agens einbringt. Das Ausmaß der Flüssigkeitsansammlung in dem praeformierten Cavum und die Bindegewebsentwicklung in der Höhlenwand dienen als Kriterium der entzündlichen Reaktion bzw. ihrer pharmakologischen Hemmung.

Methodik

Eine Luftblase von 25 ml wurde unter die Rückenhaut gespritzt, in die als Phlogisticum 0,5 ml Crotonöl (5 %ig in Sesamöl) injiziert wurden. Die Sterine I und II (1 mg/kg und 10 mg/kg) wurden als 0,2 bzw. 2 %ige Lösung in Sesamöl s.c. am selben Tage injiziert. Kontrolltiere erhielten nur die gleiche Menge Sesamöl.

Zwei Tage später wurde die restliche Luft aus der Rückenblase abgesaugt; 8 Tage nach Versuchsbeginn wurden die Tiere getötet, das an der Injektionsstelle gebildete Exsudat gemessen, getrocknet und gewogen, und außerdem das Gewicht der fibrotischen Kapselwand bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert von je 10 Tieren in nachstehender Tabelle 24 zusammengestellt.

Tabelle 24

Substanz	Dosierung (s.c.)	Exsudat/Tier Volumen (ml)	Exsudat/Tier Trockengewicht (g)	Fibrotische Kapselwand Gewicht/Tier (g)
Sesamöl	0,5 ml/kg	3,47	0,185	2,22
Sterine I u. II in Sesamöl	1,0 ml/kg	7,13	0,500	4,68
	10,0 ml/kg	3,01	0,205	4,73

Die mit den Sterinen behandelten Tiere zeigten, wie der Tabelle zu entnehmen ist, in einer Gruppe eine etwa doppelt so große Exsudatbildung und immer eine stärkere Fibroseentwicklung im Vergleich mit den Kontrolltieren.

Danach dürften diesen Sterinen keine antiphlogistischen Eigenschaften zu eigen sein.

b) Oedem-Test an Rattenpfoten:

In diesen Versuchen (32) injiziert man den Reizstoff unter die Schleimhaut einer Pfote. Am Injektionsort kommt es durch vermehrte Permeabilität der Blutgefäße (Kapillaren und Praekapillaren) zur Entstehung eines "entzündlichen" Oedems durch Flüssigkeitsansammlung im Unterhautgewebe. Die Hemmung der Volumenzunahme liefert einen Maßstab für die Beurteilung antiphlogistischer Wirkungen.

Methodik

In eine Hinterpfote der mit Urethan (1,2 g/kg i.p.) narkotisierten Ratten wurden als Phlogistica 0,1 ml Dextran (6 %) und Formaldehyd (3 %) s.c. injiziert. Die Sterine I und II (10,0 und 100 mg/kg) waren 60 Minuten vorher als 2 %ige Lösung in Sesamöl i.m. injiziert worden. Kontrolltiere erhielten wiederum nur die gleiche Menge reinen Sesamöls.

Die Oedementwicklung wurde beim Dextranversuch zu verschiedenen Zeiten, bis zu insgesamt 4 Stunden volumetrisch

und zusätzlich mit der Schublehre bestimmt.

Beim Formaldehydoedem wurden beide Hinterpfoten 90 Minuten nach Injektion des Phlogisticums abgeschnitten und gewogen. Die Beurteilung der Oedembildung (in % des Normalvolumens) erfolgte im Vergleich zur Pfotenschwellung der Kontrolltiere. Die erhaltenen Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle 25 zusammengestellt (s = Standardabweichung).

Tabelle 25

Sub.	Dosierung (i.m.)	Dextranoedem (%) m.Sterine behandelte Tiere	Kontrolltiere	Formaldehydoedem(%) m. Sterin behandelte Tiere	Kontrolltiere
Sterin I + II	10 mg/kg	119 (s=10,6%)	127(s=6%)	132 (s=7,7 %)	131(s=15,1%)
Sterin II	100 mg/kg	116(s=12,5%)		138 (s=12 %)	

Auch bei diesem Test ergaben sich keine sicheren Anhaltspunkte für einen durch Sterin I und II bedingten antiphlogistischen Effekt.

II. Tierexperimentelle Untersuchung mit verschiedenen KIGELIA-Extrakten

Da Sterin I und II offensichtlich keine antiphlogistische Wirkung besitzen, wurde die Gesamtdroge auf eine solche Wirkung überprüft. Zu diesem Zweck wurde die Droge mit Petroläther, Alkohol und Wasser (je 250 g Droge, 500 ml Lösungsmittel) extrahiert. Die hierbei erhaltenen KIGELIA-Extrakte wurden zunächst auf eine antiphlogistische Wirkung mit Hilfe des Rattenpfotenoedemtestes geprüft, wobei verschiedene oedemerzeugende Stoffe zur Anwendung kamen.

Außerdem wurden noch Versuche ausgeführt, die geeignet sind, die verschiedenen KIGELIA-Extrakte und damit auch die Droge im Tierexperiment weitgehend zu charakterisieren.

In diesem Zusammenhang interessierte wegen der abführenden Wirkung der Droge besonders die Beeinflussung der Darmmotilität.

Die Wirkung der verschiedenen Extrakte auf den Blutdruck und ihre sedierenden sowie toxischen Eigenschaften wurden auch geprüft.

Der Einfluß der Extrakte auf isolierte Organe, wie Meerschweinchen-Ileum, Ratten-Uterus, Ratten-Zwerchfell und Meerschweinchen-Herzvorhof, wurde ebenfalls getestet.

Eine kurze Beschreibung der unternommenen Versuche folgt:

a) Oedem-Test an Rattenpfoten:

Hierbei wurden in der schon beschriebenen Weise der Wasser- und Petroläther-Extrakt auf eine entzündungshemmende Wirkung hin am Modell des Rattenpfotenoedems geprüft. 2 - 3 ml wässeriger bzw. 0,5 ml Petroläther-Extrakt wurden je 5 Versuchstieren i.p. bzw. i.m. injiziert.

0,1 ml Lösung der oedemerzeugenden Substanzen (Dextran 6 %, Formaldehyd 3 % und Ovalbumin 10 % in physiologischer Kochsalzlösung) wurde 5 bzw. 60 Minuten später in eine Hinterpfote injiziert; in die andere Pfote wurde zur Kontrolle die gleiche Menge reiner Salzlösung subplantar appliziert. Die Bewertung erfolgte durch volumetrische Bestimmung über insgesamt 3 Std.. Beim Dextranoedem ergab sich eine Hemmwirkung durch beide Extraktformen:

Wässeriger Extrakt ließ eine Schwellung von 112 % (s = 20 %) des Ausgangswertes entstehen, gegenüber einem Kontrollwert von 165 % (s = 25 %).

Für Petrolätherextrakt lag der Wert bei 129 % (s = 22 %) gegenüber einem Kontrollwert von 141 % (s = 29 %; Mittelwerte von je 5 Tieren).

Formaldehyd- und Ovalbuminoedem konnten durch die Extrakte nicht positiv beeinflußt werden.

b) Untersuchungen am Ganztier:

1) Prüfung der Darmpassage an der lebenden Ratte:

Bei oraler Einwirkung zweier wässriger Extrakte kam es gegenüber den Kontrolltieren zu einer wenig verringerten Passagegeschwindigkeit des Kohleindikators : der Quotient von Wanderungsstrecke/Gesamtlänge war mit 0,77 bzw. 0,72 gegenüber dem Kontrollwert von 0,80 nur gering herabgesetzt (Mittelwerte von je 10 Tieren).

Dieser Befund scheint im Gegensatz zu den Beobachtungen am isolierten Meerschweinchen-Darm (vgl. S. 7) zu stehen. Wahrscheinlich aber hemmt die Tonuszunahme der glatten Muskulatur die normale Förderperistaltik, so daß eine verlangsamte Darmpassage resultiert.

2) Messung des Blutdrucks an der narkotisierten Ratte:

Am Blutdruck der narkotisierten Ratte bewirkten 0,5 - 1,0 ml/kg i.v. des zehnfach verdünnten wässrigen Extraktes einen schnell einsetzenden, kurzdauernden Abfall um 20 - 25 mm Hg. Mit dieser beobachteten Blutdruckwirkung ist die Gefäßverengung, die an den isolierten Hinterextremitäten der Ratte bei gleicher Verdünnung beobachtet werden konnte, nicht ohne weiteres zu vereinbaren.

3) Messung des Blutdrucks an der narkotisierten Katze:

Auch hier kam es nach i.v. Injektion von 1 ml/kg wässrigem Extrakt zu einem plötzlich einsetzenden, kurzdauernden Blutdruckabfall von etwa 30 mm Hg.

Nach Atropinisierung des Tieres konnte mit der gleichen Extraktdosis kein Blutdruckabfall mehr hervorgerufen werden (vgl. Diagramm 1, S. 76).

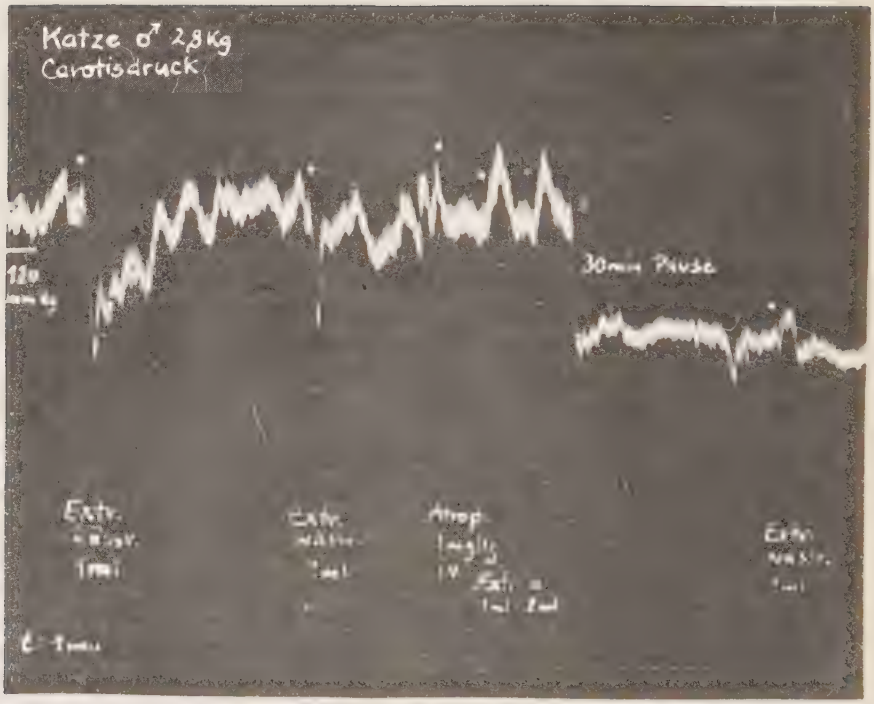


Diagramm 1

4) Orientierende Untersuchung am Ganztier:

Bei einer orientierenden Prüfung der Extraktwirkung an der Maus (0,5 - 1,0 ml i.p.) zeigte sich, daß 0,5 ml wässrigen Drogen-Extraktes zu einem auffallenden Erscheinungsbild führten:

Allgemein waren die Tiere sediert. Die Hinterbeine wurden gespreizt und beim Gehen verzögert nachgezogen oder nur passiv nachgeschleppt. Die Atmung war merklich beschleunigt. Bei höherer Dosierung entwickelte sich später Seitenlage bei erhaltenen Reflexen.

Alkohol- bzw. Petroläther-Extrakte wirkten ähnlich, aber weniger stark.

Auch bei Ratten und Mäusen bewirkten 1 - 5 ml des wässrigen Drogen-Extraktes je Tier i.p. und bei Kaninchen 10 ml i.m. eine deutliche Sedierung und bei höheren Dosen außerdem ataktische Bewegungsabläufe.

Frösche, die 1,0 ml wässrigen Extraktes in den Brustlymphsack injiziert bekamen, wurden ebenfalls stark sediert: 20 bzw. 40 Minuten nach der Injektion wurde Rückenlage zeitweilig ertragen, nach 60 bzw. 90 Minuten waren die Tiere völlig bewegungslos und schlaff. Atmung war nicht mehr zu erkennen, nur der Hautspiegelreflex des Herschlages war noch zu sehen. Am nächsten Morgen verhielten sich die Tiere wieder völlig normal.

Gekochte und filtrierte Extrakte wirkten am Ganztier ebenso wie unbehandelte Extrakte.

Petrolätherextrakt verursachte bei Mäusen und Ratten nach i.p. oder i.m. Injektion von 0,1 ml je Tier gleichartige aber schwächer ausgebildete Symptome.

5) Prüfung der Toxizität:

Bei der Prüfung des wässerigen Extraktes auf seine Toxizität konnten die in folgender Tabelle 26 zusammengestellten Ergebnisse erhalten werden:

Bei den einzelnen Extrakten erfolgte nach Zugabe zum Bad zuerst eine schnelle histaminähnliche Kontraktion, die dann in eine langsam zunehmende bradykininähnliche Kontraktion überging.

Die Petroläther- und Alkoholextrakte zeigten eine schwächere glattmuskuläre Wirkung als die wässerigen Extrakte.

Die wässerigen Extrakte aus der vorher entfetteten Droge waren stärker wirksam als diejenigen, die aus der nicht entfetteten Droge zubereitet waren.

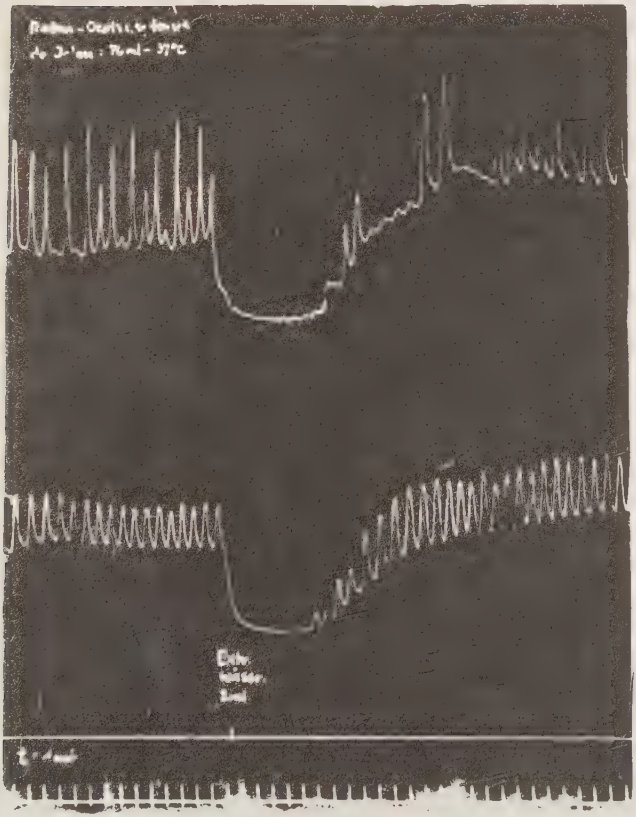
Durch vorherige oder gleichzeitige Einwirkung von Atropin (10^{-7} g/ml) oder Buscopan®(10^{-7} g/ml) oder eines Antihistaminicums (Mepyramin = N-p-Methoxybenzyl-N-(2-pyridyl-)-N-dimethyl-äthylendiamin) 10^{-7} g/ml) war die beschriebene Kontraktion vorübergehend zu lösen, dann setzte sich aber wieder eine wellenförmig verlaufende rhythmische Kontraktion gegen die Wirkung dieser Substanzen durch.

Weitere Testung von KIGELIA-pinnata-Extrakten und in gleicher Weise hergestellten Extrakten aus Cortex Frangulae, Radix Jalapae, Cascara sagrada und Aloe zeigte, daß die Extrakte dieser Pflanzenteile am Meerschweinchen-Ileum bzw. -Rectum keine Wirkung haben, die derjenigen von KIGELIA pinnata zu vergleichen wäre (wellenförmige Tonusveränderung und -verstärkung der Motorik).

2) Untersuchung am isolierten Ratten-Oestrusuterus:

Am isolierten Ratten-Oestrusuterus bewirkte der wässerige Extrakt ein Sistieren der spontanen Bewegung für etwa 5 Minuten. Danach kam es langsam wieder zur Restitution der normalen Uterusrhythmik (vgl. Diagramm 3).

Diagramm 3



3) Untersuchung am isolierten Herzvorhof des Meerschweinchens:

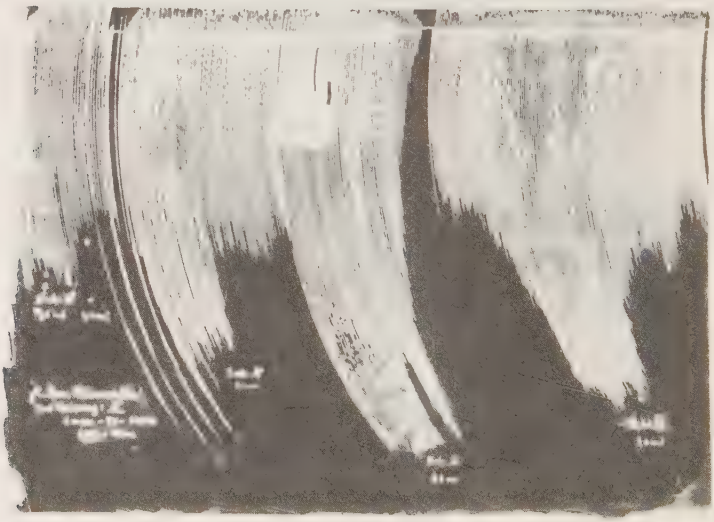
Am isolierten Herzvorhof des Meerschweinchens trat unter der Wirkung des wässerigen Extraktes eine Schädigung der Kontraktionskraft ein, die sich durch zunehmende Verkleinerung der Amplitude äußerte. Erst bei hundertfacher Verdünnung des Extraktes konnte keine Wirkung mehr festgestellt werden.

Diese Schädigung der Kontraktionskraft scheint nicht auf einer Vaguswirkung zu beruhen, da durch vagolytisch wirkende Verbindungen (Atropin usw.) keine Restitution zu erreichen war.

4) Untersuchung am Zwerchfell-Phrenicus-Präparat der Ratte nach BÜLBRING (36):

Bei diesem Versuch kam es bei indirekter elektrischer Reizung (Rechteckstromstöße: 1 msec.-4V-100 Hz-1 sec.-10 sec. Intervall) unter Einwirkung von 1 - 6 ml wässerigen Extraktes im 50 ml Bad zu einer dosisabhängigen Verkleinerung der Kontraktionsamplitude. Nach Spülung des Präparates erholte sich der Muskel völlig (vgl. Diagramm 4).

Diagramm 4



(Extrakt III wurde sofort nach Extraktion untersucht)

Durch die pharmakologischen Untersuchungen der reinen Sterine konnten keine Anhaltspunkte erhalten werden, die eine Erklärung für die volksmedizinische Verwendung gebracht hätten.

Deshalb wurden die Petroläther-, Alkohol- und Wasser-Extrakte untersucht.

Wegen einer durch die volksmedizinische Verwendung vermuteten antiphlogistischen Wirkung wurden die Extrakte am Modell der Rattenpfoten auf ihren Einfluß auf verschiedene oedemerzeugende Substanzen untersucht. Dabei zeigte sich eine mäßig starke Hemmwirkung.

Außerdem bewirkten die Extrakte ein kurzdauerndes Absinken des Blutdruckes bei der narkotisierten Ratte (20 - 25 mm Hg) und bei der narkotisierten Katze (30 mm Hg).

Im Vordergrund der tierexperimentell festgestellten Wirkungen stand eine Sedierung, die sowohl bei Kaltblütern (Esculenten) als auch bei Warmblütern (Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen) nach parenteraler Injektion der Extrakte eintrat.

Diese Sedierung war zum Teil mit motorischen Ausfallerscheinungen verbunden.

Bei gleichen Injektionsvolumina wirkte der wässerige Extrakt am deutlichsten sedierend.

An isolierter glatter Muskulatur bewirkte der wässerige Extrakt verstärkte Motilität mit wellenförmigen Tonuswechsel. In vivo war aber keine Beeinflussung der Darmpassage sicherzustellen.

Weiter wurden muskuläre Effekte durch die Extrakte am Rattenuterus (ein Sistieren der spontanen Bewegung für etwa 5 Minuten), am isolierten Vorhof des Meerschweinchens (Schädigung der Kontraktionskraft, die sich durch zunehmende Verkleinerung der Amplitude äußerte) und am Zwerchfellpräparat der Ratte (dosisabhängige Verkleinerung der Kontraktionsamplitude) nachgewiesen.

Die am isolierten Darm und bezüglich des Blutdrucks beobachteten Effekte lassen in Zusammenhang mit der sedieren-

den Wirkung vermuten, daß besonders die wässerigen Extrakte von KIGELIA pinnata wahrscheinlich neben anderen Wirkstoffen geringe Mengen an Histamin enthalten und außerdem eine Substanz, die im Organismus kininartige Wirkungen hervorruft, wie sie von bestimmten Polypeptiden bekannt sind.

Herrn Dr. med. H. A n t w e i l e r sei an dieser Stelle herzlichst gedankt für die Anleitung bei der Durchführung der pharmakologischen und toxikologischen Prüfungen.

III. Experimenteller Teil

A. Prüfung auf Alkaloide mittels Alkaloidfällungsreagenzien (37):

a) 100 g gepulverte Gesamtdroge werden nach dem Perkolatorprinzip mit 1 l Petroläther, 500 ml ammoniakhaltigem Chloroform (ca. 3 %ig) und 500 ml reinem Chloroform in der angegebenen Reihenfolge extrahiert.

Das mit ammoniakhaltigem und ammoniakfreiem Chloroform erhaltene Perkolat wird mit verdünnter Schwefelsäure gegengeschüttelt; die in der Wasser- bzw. Chloroformphase eventuell vorhandenen Alkaloide normaler bzw. geringer Basizität werden entsprechend den unter c) gemachten Angaben auf Alkaloide geprüft.

b) 100 g gepulverte und mit Petroläther entfettete Gesamtdroge werden mit 500 ml 10 %iger Schwefelsäure einige Stunden mazeriert und das Filtrat ebenfalls entsprechend den unter c) gemachten Angaben auf Alkaloide geprüft.

c) Alkaloidfällungsreagenzien:

Obige Extrakte werden mit folgenden Alkaloidfällungsreagenzien direkt versetzt bzw. nach fleckenförmigem Auftragen auf Filtrierpapier mit diesen besprüht (Spottest):

Jodjodkalium-Lösung (WAGNERS Reagenz):

5 g Jod werden in 100 ml einer 10 %igen Kaliumjodid-Lösung gelöst.

Alkaloide geben hellkaffeebraune bis dunkel-cremebraune Niederschläge, die meist flockig oder pulverig und in verdünnter Salzsäure in der Kälte unlöslich sind.

Kaliumquecksilberjodid-Lösung (MEYERS Reagenz):

1,35 g Quecksilber-II-chlorid werden in 100 ml einer 5 %igen Kaliumjodid-Lösung gelöst.

Die Sulfate oder Hydrochloride fast sämtlicher Alkaloide geben in wässeriger Lösung amorphe oder kristalline Niederschläge.

Kaliumwismutjodidlösung (DRAGENDORFFS Reagenz):

4 g Wismutsubnitrat werden in 10 ml Salpetersäure vom spez. Gew. 1,18 gelöst und in eine Lösung von 13,5 g

Kaliumjodid in 40 ml Wasser gegossen. Nach einiger Zeit kristalliert Kaliumnitrat aus, man läßt deshalb zwei bis drei Tage absitzen, gießt dann ab und füllt auf 50 ml auf.

Alkaloide geben hellgelbe bis ziegelrote Fällungen.

Phosphormolybdänsäure (SONNENSCHEINS Reagenz):

8 g Phosphormolybdänsäure werden in 25 ml Wasser gelöst und mit soviel Salpetersäure versetzt, bis die Lösung goldgelb gefärbt ist.

Alkaloide bilden mit diesem Reagenz amorphe, hell- oder braungelbe Niederschläge, die nach einiger Zeit eine blaue oder grüne Färbung annehmen.

Pikrinsäure:

Es wird eine gesättigte wässerige Lösung von Pikrinsäure hergestellt.

Alkaloide geben mit dem Reagenz sowohl amorphe, wie kristalline Fällungen.

Gerbsäure (Tannin):

Es ist eine frischbereitete Lösung von 5 g Gerbsäure in 100 ml Wasser zu verwenden.

Die Niederschläge sind weiß bis gelblich, amorph und in Salzsäure teilweise löslich.

Die in Abschnitt a) und b) hergestellten Extrakte gaben mit den oben genannten Alkaloidfällungsreagenzien keine Niederschläge (vgl. S. 85 und 8).

B. Aufarbeitung der Droge

1) Extraktion der Droge und Gewinnung des KIGELIA-Öls

Die in einer Gewürzmühle sehr fein gemahlene Gesamtdroge (30 kg) wird portionsweise (2,5 kg) mit Petroläther in ein Porzellanrohr (Länge 150 cm; Durchmesser 8 cm) eingeschlämmt und anschließend mit 65 Liter des gleichen Lösungsmittels perkoliert. Das Perkolat hinterläßt nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels eine ölige, braungelbe Flüssigkeit von stark würzigem Geruch (KIGELIA-Öl). Ausbeute: 1590 g; 5,3 % bezogen auf die Gesamtdroge.

2) Gewinnung des unverseifbaren und verseifbaren Anteils aus dem KIGELIA-Öl.

350 g Kaliumhydroxid werden in 350 ml Wasser gelöst und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit 1400 ml Methanol versetzt. Zu dieser Lösung werden 200 g KIGELIA-Öl gegeben und die Mischung während der Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird 12 Stunden lang unter Stickstoffatmosphäre zum Sieden erhitzt und dann der größte Teil des Methanols im Vakuum unterhalb 50°C abdestilliert. Die zurückbleibende wässerige Phase wird 6 mal mit je 500 ml Äther ausgeschüttelt, die vereinigten Ätherphasen mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der hierbei erhaltene Rückstand wird erneut unter sonst gleichen Bedingungen verseift und aufgearbeitet (= unverseifbarer Anteil).

Die verbleibenden alkalischen Wasserphasen werden ebenfalls vereinigt, mit 5n-Schwefelsäure angesäuert und wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Die hierbei auftretenden sehr hartnäckigen Emulsionen lassen sich durch kurzes Erwärmen im Wasserbad auf 40 - 50°C beseitigen. Die vereinigten Ätherphasen werden dann mit Wasser, das vorher unter Stickstoffatmosphäre auszukochen ist, gegengeschüttelt, anschließend mit Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit (= verseifbarer Anteil).

Ausbeute:

Unverseifbarer Anteil	: 18 g; 9 % bez. auf KIGELIA-Öl
Verseifbarer Anteil	: 150 g; 75 % bez. auf KIGELIA-Öl

3) Gewinnung des "Rohsterins":

1 g des unverseifbaren Anteils des KIGELIA-Öls wird mit heißem Methanol wiederholt extrahiert. Die dabei ungelöst zurückbleibende braune Masse wird abfiltriert; sie ist frei von Sterinen und besitzt einen eigenartigen Geruch. Die methanolischen Filtrate werden vereinigt und auf etwa 15 ml eingeengt. Beim Abkühlen auf -20°C scheidet sich ein fast farbloses kristallines Produkt ab, das zur weiteren Reinigung noch zwei- bis dreimal aus heißem Methanol umzukristallisieren ist. Das auf diese Weise erhältliche "Rohsterin" schmilzt unscharf zwischen 120 bis 124° C.

Ausbeute:

190 mg "Rohsterin";
19 % bezogen auf den unverseifbaren Anteil.

4) Isolierung von Sterin I und II:

1,2 g "Rohsterin" werden in 5 ml Benzol-Essigester (9 + 1) gelöst und einer Kieselgelsäule (Kieselgel ohne Bindemittelzusatz; Säulenlänge 98 cm; Durchmesser 3 cm) aufgegeben und anschließend mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch fraktioniert eluiert.

Die abgenommenen 5 ml-Eluatfraktionen werden eingeengt; dünnschichtchromatographisch wird ihre Zusammensetzung ermittelt (Kieselgel-G-Platten; Fließmittel: Benzol-Essigester 9 + 1).

Fraktionen gleicher bzw. ähnlicher Zusammensetzung werden vereinigt, wobei im "Vorlauf" praktisch reines Sterin II, im "Nachlauf" Sterin I enthalten ist. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wird der Rückstand aus Methanol kristallisiert. Die zwischen "Vorlauf" und "Nachlauf" eluierbaren Fraktionen sind Mischfraktionen; sie bestehen aus unterschiedlichen Mengen an Sterin I und Sterin II und werden nach Vereinigung erneut an Kieselgel unter sonst gleichen Bedingungen chromatographiert. Nach mehrmaliger Wiederholung dieser Arbeitsweise wird Sterin I und II weitgehend quantitativ voneinander getrennt und in kristallinier Form erhalten. Durch anschließende Elution der Kieselgelsäule mit Methanol läßt sich ein weiteres

Sterin (Sterin III) abtrennen.

Ausbeute:

Sterin I : 840 mg; 79,2 % bezogen auf "Gesamtauswaage".
Sterin II : 180 mg; 16,9 % bezogen auf "Gesamtauswaage".
Sterin III : 41 mg; 3,9 % bezogen auf "Gesamtauswaage".

C. Charakterisierung von Sterin I und II

1) Allgemeine Bemerkungen:

Sämtliche Schmelzpunkte wurden mit dem KOFLER-Schmelzpunktbestimmungsapparat ermittelt.

Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium BEETZ, Kronach/Ofr. und BERNHARD, Mühlheim/Ruhr, durchgeführt.

Die optische Aktivität wurde mit dem Polarisationsapparat nach LIPPICH der Firma Zeiss-Winkel, Göttingen, unter Verwendung eines 2-dm-Rohres bestimmt.

Die UV-Spektren wurden in einer 1-cm-Quarzküvette mit dem Graphi-Spectral-Jouan (Paris) aufgenommen.

Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer-Gerät aufgenommen.

Für die Gaschromatographischen Untersuchungen wurde ein Perkin Elmer S 6/2 HF Gerät verwendet.

2) Elementaranalye und Molekulargewichtsbestimmung von Sterin I:

Zur weiteren Reinigung werden 30 mg des adsorptionschromatographisch erhaltenen Sterins I (vgl. S. 88) in 30 ml Cyclohexan-Essigester (70+30) gelöst und die Lösung adsorptiv über Kieselgel (Säulenlänge: 20 cm; Durchmesser: 5 mm) filtriert. Das Filtrat wird unter Stickstoffatmosphäre vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand (24 mg) aus 2 ml heißem Methanol umkristallisiert.

Das nach dem Abkühlen auf $-20^{\circ}C$ in Form silberweißer Plättchen kristallisierende Sterin I wird abgetrennt, mit kaltem Methanol gewaschen und erneut unter gleichen Bedindungen kristallisiert. Das hierbei erhältliche Kristallisat ist dünnschichtchromatographisch rein und wird anschließend im Vakuum (0,15 Torr) bei $145-150^{\circ}C$ mikrosublimiert.

Elementaranalyse:

F_p : 136°C.

Einwaage 1): 4,077 mg*; 12,39 mg CO_2; 4,28 mg H_2O
2): 4,210 mg*; 12,62 mg CO_2; 4,54 mg H_2O
3): 4,736 mg**; 14,475 mg CO_2; 5,25 mg H_2O
4): Molgew.
1,157 mg*; 11,345 mg Kampfer;
K = 35,9°C; Δt^o = 11,5°C
* = Kristallisat
** = Sublimat

Sterin I : $C_{21}H_{36}O$ (MG. 304,5)

	C %	H %	O %	MG.
ber.:	82,83	11,92	5,25	304,5
gef. 1)	82,93	11,75	(5,32)	318
2)	82,90	11,80	(5,30)	
3)	82,79	11,96	(5,25)	
gef. Mittelwert	82,87	11,84	(5,29)	

3) Optische Aktivität von Sterin I:

Einwaage : 50,2 mg/4,0 ml Chloroform
abgelesener Drehwinkel : α = -0,70° (2 dm Rohr)
Spez. Drehung : $[\alpha]_D^{20}$ = -28,6° (c= 1,255; Chlf.)

4) Acylierung von Sterin I:

a) Acetylierung mittels Acetanhydrid:

50 mg Sterin I werden mit 10 ml Acetanhydrid und einer Messerspitze voll wasserfreiem Natriumacetat 3/4 Stunden lang unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Anschließend wird das überschüssige Acetanhydrid im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mit wenig Wasser und Äther behandelt.

Die Ätherphase wird mit Wasser gegengeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und der nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels verbleibende Rückstand aus Methanol kristallisiert. Das Kristallisat schmilzt bei 122° und ist dünnschichtchromatographisch rein.

Ausbeute: 42 mg; (73,8 % d. Th.).

Elementaranalyse:

Einwaage : 4,012 mg; 11,62 mg CO_2; 3,91 H_2O
: 6,800 mg; f. Acetylbest.; 1,75 ml $n/_{100}$ NaOH
: 1,131 mg; f. Mol.gew.; 11,472 mg Kampfer;
K = 35,9°; Δt° = 11,7° C

Sterin-I-acetat: $C_{23}H_{38}O_2$ (MG. : 346,5)

	C %	H %	O %	CH_3CO	MG.
ber. :	79,72	11,05	9,23	12,1	346,5
gef. :	79,04	10,93	(10,03)	11,1	331

Das gleiche Produkt wird erhalten, wenn die Acetylierung in Abwesenheit von Natriumacetat ausgeführt wird.

b) Acylierung mittels p-Nitrobenzoylchlorid:

50 mg Sterin I werden unter Eiskühlung in eine Lösung von 100 mg p-Nitrobenzoylchlorid in 10 ml trockenem Benzol und 5 ml Pyridin eingetragen. Nach 15 Minuten langem Stehen bei Raumtemperatur wird das Gemisch 1 1/2 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Zusatz von 70 ml 0,5n Salzsäure zu dem erhaltenen Reaktionsgemisch wird mit Dichloräthan ausgeschüttelt, die organische Phase mit 2n Natronlauge und Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird eine aus Aceton kristallisierbare Verbindung vom Schmelzpunkt 180°C erhalten, die dünnschichtchromatographisch einheitlich ist.

Ausbeute: 38 mg; (51 % d. Th.)

Stickstoffbestimmung von Sterin I-p-nitrobenzoat:

Einwaage: 2,242 mg; 0,061 cm^3 N_2(t^o/P mm = 24/754).
Sterin-I-p-nitrobenzoat : $C_{28}H_{39}NO_4$ (MG. 453,63).

	N %
ber.:	3,09
gef.:	3,10

5) Oxydation von Sterin I:

Herstellung des Chromsäure-Reagenzes (37):

5 g Chromsäureanhydrid werden portionsweise in eine eisgekühlte Mischung von 20 ml tertiär-Isobutanol und 20 ml Tetrachlorkohlenstoff unter ständigem Rühren eingetragen. Nach Zusatz von 65 ml Tetrachlorkohlenstoff wird über wasserfreies Natirumsulfat filtriert und das Filtrat über wasserfreiem Natriumsulfat bei 4°C aufbewahrt.

Oxydation von Sterin I:

40 mg Sterin I werden in 8 ml wasserfreiem Pyridin gelöst, die Lösung mit 8 ml Chromsäure-Reagenz versetzt und über Nacht stehengelassen.

Anschließend wird die Reaktionslösung jeweils 15 Minuten lang mit 16 ml frisch bereiteter gesättigter Zitronensäurelösung in Äthanol und nach Zusatz von 160 ml n-Schwefelsäure mit 160 ml Dichloräthan geschüttelt. Die obere wässerige Phase wird noch 2 mal mit 160 ml Dichloräthan gegengeschüttelt.

Die Dichloräthanphasen werden vereinigt und mit je 160 ml Wasser, 10 % (w/v) Natriumbisulfitlösung, 1n-Natronlauge und Wasser in der angegebenen Reihenfolge gewaschen.

Nach dem Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert. Die bei 166°C schmelzenden Nadeln sind dünnschichtchromatographisch rein.

Ausbeute: 38 mg; (93,50 % d. Th.).

Elementaranalyse:

Einwaage : 3,5 mg; 10,40 mg CO_2; 3,36 mg H_2O.
Oxydationsprodukt von Sterin I: $C_{21}H_{32}O$ x 1/2 H_2O (MG. 309,5)

	C %	H %	O %
ber. :	81,50	10,74	7,75
gef. :	81,09	10,74	

6) Fällung von Sterin I mit Digitonin:

7,5 mg Digitonin werden in 5 ml 90 %igem Äthanol gelöst und mit einer heißen Lösung von 5 mg Sterin I in 2 ml 95 %-igem Äthanol versetzt.

Nach wenigen Minuten kommt es zur Abscheidung von 11,8 mg prismatischer Kristalle, die sich beim Erhitzen über 260° allmählich zersetzen.

Charakterisierung von Sterin II:

20 mg Sterin II werden wiederholt aus je 2 ml Methanol umkristallisiert. Die farblosen Prismen schmelzen bei 76°C und sind dünnschichtchromatographisch rein.

a) Elementaranalyse:

Einwaage : 4,192 mg; 12,83 mg CO_2; 4,54 mg H_2O
Sterin II : $C_{25}H_{42-44}O$ (MG. 358,4 bzw. 360,6)

	C %	H %	O %
ber. für (H_{44}):	83,27	12,30	4,43
ber. für (H_{42}):	83,73	11,81	4,47
gef. :	83,52	12,12	(4,36)

b) Optische Aktivität von Sterin II:

Einwaage : 13,0 mg/4,0 ml Chloroform;
abgelesener Drehwinkel: $\alpha = + 0,48^{\circ}$
Spez. Drehung : $\left[\alpha\right]_D^{20^{\circ}} = + 73,8^{\circ}$ (c = 0,325; Chloroform).

D. Nachweis der im verseifbaren Anteil des KIGELIA-Öls enthaltenen Fettsäuren

1) Darstellung der Methylester der KIGELIA-Fettsäuren:

Die Methylester der KIGELIA-Fettsäuren werden mittels Diazomethan, das aus p-Tolylsulfonylmethylnitrosoamid nach DE BOER (38) hergestellt wird, gewonnen.

150 g KIGELIA-Fettsäuren (vgl. S. 54) werden in 500 ml Äther gelöst und mit 1,5 l einer ätherischen Lösung von Diazomethan (82 g Diazomethan enthaltend) in der Kälte versetzt. Das Gemisch bleibt 8 Stunden lang stehen; nach Beendigung der Umsetzung wird das Lösungsmittel weitgehend abdestilliert und der Rückstand im Vakuum vollständig von Lösungsmittelresten befreit.

Ausbeute: 145 g KIGELIA-Fettsäuremethylester.

2) Papierchromatographische Untersuchung der KIGELIA-Fettsäuren in Form ihrer Methylester:

a) Papier-Imprägnierung:

Auf Papierstreifen Schleicher & Schüll 2043b (35 cm x 15 cm) werden zunächst die Startpunkte markiert.

Die gewogenen Streifen werden dann 30 sec. in Undecan (Kp. 190-220°C) eingelegt und nach dem Abtropfen 10 Minuten lang zwischen Filterpapier und zwei Glasplatten bei einer Gewichtsbelastung von 4 kg solange abgepresst, bis der durch Wägung ermittelte Imprägnierungsgrad etwa 190 - 280 mg Undecan pro Gramm Papier beträgt.

b) Angaben zur papierchromatographischen Technik:

Die Substanzen werden in 2 %iger Toluollösung aufgetragen und mit dem auf S. 54 angegebenen Fließmittel auf- bzw. absteigend chromatographiert.

Um eine Entmischung des Fließmittels I zu vermeiden, werden diesem 4 % Essigsäure (90 %) zugesetzt.

Vor dem Anfärben der Chromatogramme werden diese 2 Stunden bei 120°C getrocknet und dann 45 Minuten in eine verdünnte Kupferacetatlösung (10 ml gesättigte Kupferacetatlösung + 240 ml Wasser) eingelegt. Anschließend werden die Chromatogramme 15 Minuten lang in fließendem Wasser gewaschen und dann in eine verdünnte Kaliumferrocyanidlösung (50 ml 7,5 %ige wässerige Lösung + 250 ml Wasser) eingelegt; hierbei färben sich die den Fettsäuren entsprechenden Chromatogrammflecken dann dunkelbraun auf gelbem bis hellbraunem Untergrund.

c) Papierchromatographische Ergebnisse: s.S.55 und 65.

3) Papierchromatographische Untersuchung der KIGELIA-Fettsäuren in Form ihrer Hydroxamate:

a) Überführung der KIGELIA-Fettsäure-Methylester in das entsprechende Hydroxamatgemisch:

100 mg der wasserfreien KIGELIA-Fettsäuremethylester werden mit einer Mischung von 1 ml methanolischer 1n-Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung und 2 ml methanolischer 1n-Kalilauge versetzt und nach dem Abfiltrieren des ausgefallenen Kaliumchlorids solange auf dem Wasserbad zum Sieden erhitzt, bis eine klare Lösung entsteht.

Anschließend wird durch Zusatz von Tetrahydrofuran-Essigsäure (4:1) neutralisiert.

b) Papier-Imprägnierung:

Hydrophobierte Papiere der Firma Schleicher & Schüll (2043b acetyliert) und Binzer, Hatzfeld/Eder (Acetylpapier 202/40/100) mit einem Acetylierungsgrad von 25 % und 40 % werden für diese Versuche eingesetzt.

c) Angaben zur papierchromatographischen Technik:

Von den unter Abschnitt a) erhaltenen Lösungen wird am Startpunkt nur etwa so viel aufgetragen, daß von den nachzuweisenden Fettsäuren etwa 20 - 50 g vorliegen.

Vor dem Anfärben der Chromatogramme werden diese 5 Minuten bei 90°C getrocknet und dann mit einer 2 %igen Eisen-III-chlorid-Lösung in Äthanol-n-Butanol (1:4) besprüht. Die Hydroxamate erscheinen als purporrote bis rotbraune Flecken.

d) Papierchromatographische Ergebnisse: s. S. 56 .

4) Identifizierung der durch fraktionierte Destillation als "Tontellerkristallisat" (s.S. 59) abtrennbaren Verbindungen:

a) Palmitinsäuremethylester (aus Fraktion 1 u. 2):

F_p = 28,5° C

Elementaranalyse:

Einwaage : 4,950 mg; 13,770 mg CO_2; 5,490 mg H_2O

Palmitinsäuremethylester: $C_{17}H_{34}O_2$ (MG. 270,5)

	C %	H %	O %
ber. :	75,52	12,64	11,84
gef. :	75,90	12,42	(11,68)

b) Palmitolein- bzw. Palmitlinolsäuremethylester (aus Fraktion 3):

F_p - 26° C

Elementaranalyse:

Einwaage 1) : 5,126 mg; 14,280 mg CO_2; 5,480 mg H_2O
2) : 4,400 mg; 12,385 mg CO_2; 4,500 mg H_2O

Palmitoleinsäuremethylester: $C_{17}H_{32}O_2$ (MG.: 268,4).

Palmitlinolsäuremethylester: $C_{17}H_{30}O_2$ (MG.: 266,4).

	C %	H %	O %
ber.f.$C_{17}H_{32}O_2$:	76,07	12,01	11,92
ber.f.$C_{17}H_{30}O_2$:	76,64	11,35	12,01
gef. f. 1) :	76,07	11,97	(11,96)
gef. f. 2) :	76,81	11,45	(11,74)
Mittelwert:	76,44	11,71	(11,45)

c) Sterinsäuremethylester (aus Fraktion 4, 5 u. 6):

F_p = 36° C

Elementaranalyse:

Einwaage : 1,953 mg; 5,420 mg CO_2; 2,190 mg H_2O

Stearinsäuremethylester: $C_{19}H_{38}O_2$ (MG. : 298,5).

	C %	H %	O %
ber. :	76,44	12,84	10,72
gef. :	75,72	12,54	

5) Gaschromatographische Untersuchung:

Daten zur Gaschromatographischen Untersuchung (vgl. S. 60).

Säule	: 20 %iges Silikonhochvakuumfett auf Kieselgur.
Säulentemperatur	: 180° bzw. 220° C.
Eingangsdruck	: 0,5 kg/cm^2.
Detectortemperatur	: 350° C.
Trägergasströmung	: 30 ml He/Min.

Kristalline Substanzen wurden in benzolischer Lösung, flüssige Produkte ohne Lösungsmittel zur Anwendung gebracht.

6) Isolierung und Identifizierung ungesättigter KIGELIA-Fettsäuremethylester über ihre Quecksilber-acetat-Addukte:

a) Trennung der gesättigten von den ungesättigten Fettsäuremethylestern:

50 g Quecksilberacetat und 4 g Essigsäure werden in 95 %-igem Methanol zu einem Liter gelöst. 50 ml dieser Lösung werden mit 1 g KIGELIA-Fettsäuremethylester versetzt und nach kräftigem Schütteln in einer Flasche gut verschlossen im Dunkeln stehen gelassen. Nach mehrtägigem Stehen dieser Lösung wird diese einer Craig-Verteilung (26 Elemente) in an sich bekannter Weise unterworfen, wobei Petroläther als mobile und Methanol als stationäre Phase (Volumenverhältnis 50 ml : 50 ml) Verwendung findet.

Über Verlauf der Verteilung vgl. S. 66 .

Die Petrolätherphasen der Elemente 21-25 werden vereinigt und vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand enthält die gesättigten Fettsäuremethylester.

Ausbeute: 0,15 g (≙ 18 % bezogen auf Gesamtauswaage).

Die Methanolphase der Elemente 0-7 werden vereinigt und nach Zusatz von Salzsäure wiederholt mit Petroläther ausgeschüttelt, die vereinigten Petrolätherphasen werden vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand enthält die ungesättigten KIGELIA-Fettsäuremethylester.

Ausbeute: 0,67 g (82 % bezogen auf Gesamtauswaage).

b) Dünnschichtchromatographische Untersuchung der ungesättigten KIGELIA-Fettsäuremethylester in Form ihrer Quecksilberacetat-Addukte:

1) Überführung der ungesättigten Fettsäuremethylester in die Quecksilberacetat-Addukte:

500 mg ungesättigte KIGELIA-Fettsäure-Methylester (vgl. S. 66) werden mit einer Lösung von 14 g Quecksilber-II-acetat in einem Gemisch von 250 ml Methanol, 2,5 ml Wasser und 0,5 ml Eisessig versetzt und 48 Stunden lang im Dunkeln stehen gelassen. Dann wird bei weniger als 30° C im Vakuum zur Trockene destilliert, der Rückstand in 30 ml Chloroform suspendiert und fünfmal mit je 20 ml Wasser ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wird mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum schonend abdestilliert und der Rückstand (ca. 1,8 g) in 6 ml Chloroform gelöst (= Addukt-Lösung).

Die Ausbeute an Quecksilberacetat-Addukten soll bei ungesättigten Fettsäuremethylestern etwa 2 g, entsprechend 480 mg Gesamtfettsäure-Methylester, betragen; gefunden wurden 1,8 g.

2) Angaben zur dünnschichtchromatographischen Technik:

12,5 g Kieselgel-G-Merck und 29,0 g Kieselgur-G-Merck werden gemischt, in 75 ml Wasser suspendiert und mittels Streichgerät auf 2 Glasplatten (20 cm x 20 cm) aufgetragen; die Platten werden anschließend 90 Min. lang bei 55° C getrocknet.

Als Fließmittel wird Isobutanol-Ameisensäure-Wasser (100: 0,5:15,7) verwendet.

Vor dem Chromatographieren ist die Kammer mit dem Fließmittel mehrere Stunden zu sättigen.

Pro Platte werden 45 - 60 mg Addukt (= 0,15-0,2 ml Addukt-Lösung bzw. 11 - 15 mg Fettsäuremethylester) strichförmig aufgetragen.

Die Laufzeit beträgt bei einer Steighöhe von 16,5 cm und 20° C etwa 6 Std.

Nach dem Chromatographieren werden die Platten sofort im kalten Luftstrom etwa 1 Minute vorgetrocknet und die noch feuchten Platten mit einer 2 %igen isobutanolischen Diphenylcarbazonlösung besprüht. Die einzelnen Addukte werden als blauviolett bis rotviolett gefärbte Flecken auf schwach-rosa gefärbtem Untergrund sichtbar.

3) Quantitative Untersuchungen:

Auf 5 Glasplatten, die nach den unter 2) gemachten Angaben hergestellt werden, wird insgesamt 1 g der gemäß 1) hergestellten Quecksilberacetat-Addukte (≙ 3,33 ml Adduktlösung) aufgetragen und chromatographisch unter sonst gleichen Bedingungen getrennt. Nach dem Besprühen mit 2 %iger Diphenylcarbazonlösung in Isobutanol werden die angefärbten Schichten (A, B bzw. C) entsprechend ihrem R_f-Wert abgenommen, vereinigt und jeweils mit 20 ml einer methanolischen 5 %igen Ammoniumrhodanidlösung und 2 ml rauchender Salzsäure versetzt. Nach kräftigem Umschütteln bleibt die Mischung eine Stunde lang im Dunkeln stehen und wird anschließend mit 80 ml Wasser versetzt und dreimal mit je 50 ml Petroläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Petrolätherauszüge werden dreimal mit Wasser gewaschen und mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die nach dem Abdestillieren zurückbleibenden öligen Produkte A, B bzw. C (vgl. S.67) werden ausgewogen und entsprechend den unter 4) angegebenen DC-Bedingungen identifiziert.

Ausbeute:

Fraktion A : 650 mg ≙ 63,4 % Ölsäuremethylester.
Fraktion B : 34 mg ≙ 3,3 % Linolsäuremethylester.
Fraktion C : 342 mg ≙ 33,3 % Linolensäuremethylester.

4) Die nach 3) erhaltenen Fraktionen A, B bzw. C werden dünnschichtchromatographisch unter Verwendung von Ameisensäure-Acetonitril-Aceton (2+2+1) als Fließmittel auf Paraffinöl imprägnierten und bei 120°C aktivierten Kieselgur-G-Platten mit Ölsäure-, Linolsäure- und Linolensäuremethylester verglichen.

Die Imprägnierung der Kieselgur-Platten erfolgt in der Weise, daß diese mit Petroläther-Paraffin (IR-Merck) (9+1) als Fließmittel in üblicher Weise vorbehandelt und anschließend luftgetrocknet werden.

Die Anfärbung der Chromatogramme erfolgt mit gasförmigem Osmiumtetroxid.

Die dünnschichtchromatographischen Ergebnisse wurden auf S. 68 - diskutiert.

5) Hydrierung der drei regenerierten ungesättigten Fettsäuremethylester:

3 mg der oben erhaltenen Fraktionen A, B bzw. C werden in je 3 ml Tetrahydrofuran p.A. gelöst und in Gegenwart von Raney-Nickel als Katalysator hydriert.

Fraktion A und B lassen sich bei Raumtemperatur hydrieren, Fraktion C dagegen nur bei etwa 50°C.

Die Hydrierungsprodukte schmelzen bei 35°C. Der Mischschmelzpunkt mit Stearinsäuremethylester (F_p = 38°C) führte zu keiner Depression.

IV. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die in der Volksmedizin Afrikas und des Sudans verwendeten Früchte der KIGELIA pinnata, einer in der Literatur nur selten erwähnten Bignoniaceen-Art, auf Inhaltsstoffe hin untersucht, die möglicherweise mit der Verwendungsart der Droge in Zusammenhang stehen könnten.

Die Früchte der KIGELIA pinnata sind frei von Alkaloiden und enthalten neben größeren Mengen an Pflanzenöl (=KIGELIA-Öl) einige Sterine, von denen zwei in kristalliner Form isoliert werden konnten. Diese beiden Sterine werden im Rahmen dieser Arbeit Sterin I und II genannt.

Sterin I und II konnten auf schonende Weise chromatographisch aus dem KIGELIA-Öl in geringer Menge abgetrennt werden. Mit Hilfe der auf diese Weise gewonnenen Sterine ließ sich dann nachweisen, daß Sterin I und II sich in unveränderter Form auch aus dem unverseifbaren Anteil des KIGELIA-Öls gewinnen lassen, wodurch die Isolierung dieser Sterine wesentlich vereinfacht wird. Durch Behandlung des unverseifbaren Anteils mit heißem Methanol wurde ein Steringemisch erhalten, aus dem durch Adsorptionschromatographie an Kieselgel unter Verwendung von Benzol-Essigester (9 + 1) als Elutionsmittel Sterin I und II praktisch quantitativ abgetrennt werden konnten. Sterin I bzw. II ist demnach in den Früchten der KIGELIA pinnata zu etwa 0,071 % bzw. 0,01 % enthalten.

Sterin I schmilzt bei 136° C, es ist optisch aktiv und mit Digitonin fällbar. Elementaranalyse und Molekulargewichtsbestimmung führten zu der Summenformel $C_{21}H_{36}O$. Sterin I wurde durch sein UV- und IR-Spektrum, sowie durch Farbreaktionen und durch sein dünnschichtchromatographisches Verhalten charakterisiert. Von Sterin I konnten außerdem ein Acetyl- und ein p-Nitrobenzoyl-Derivat hergestellt werden, deren Elementaranalyse obige Summenformel zusätzlich bestätigten. Unter Berücksichtigung der chemischen und physikalischen Eigenschaften wird für Sterin I die Struktur eines methyl- bzw. äthylsubstituierten Pregnan- bzw. Androstanderivates diskutiert.

Sterin II schmilzt bei 76° C, es ist ebenfalls optisch aktiv, läßt sich mit Digitonin jedoch nicht fällen. Für Sterin II ergab sich elementaranalytisch die Summenformel $C_{25}H_{42-44}O$. Es

wurde durch sein UV- und IR-Spektrum, sowie durch verschiedene Farbreaktionen und durch sein chromatographisches Verhalten charakterisiert.

In dem verseifbaren Anteil des KIGELIA-Öls konnten mit Hilfe der Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie und Gaschromatographie neben geringen Mengen Capryl-, Caprin-, Laurin-, Palmitin- und Stearinsäure hauptsächlich ungesättigte Fettsäuren nachgewiesen werden, die teilweise auch isoliert werden konnten. Etwa 82 % des verseifbaren Anteils bestehen aus den ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (63,4 %), Linolsäure (3,3 %) und Linolensäure (33,3 %).

Für Sterin I und II ließen sich tierexperimentell keine Hinweise erbringen, die mit der volksmedizinischen Verwendung der Droge als Antiphlogisticum und Antirheumaticum in Zusammenhang hätten gebracht werden können.

Es wurden deshalb ergänzende Versuche durchgeführt, die die Wirkung der Droge in Form verschiedener Extrakte am Ganztier und an verschiedenen isolierten Organen zeigen sollten. Versuche dieser Art ließen jedoch keinen wesentlichen Zusammenhang zwischen der tierexperimentell feststellbaren Wirkung und der in der Volksmedizin bekannten Wirkung erkennen.

V. Literaturverzeichnis

1) : IMP. BRENAN, P.J. GREENWAY; Imp.For. Inst. oxf. check list 5, Tanganica Territory (1949).

2) : C.G. SANTESSON; Ark.Bot., 20 A, 1 (1926).

3) : C.K. BARIN; Bull. Dep. Agric. Rhodes, 56, Nov. (1939).

4) : W. GILGES; Trees in South Africa, 5, 17 (1955).

5) : D.A. ROSENTHAL; Synopsis Plantarum diaphoricum, Verl. F. Enke, Erlangen, 494 (1861).

6) : G. DRAGENDORFF; Die Heilpfl. der versch. Völker u. Zeiten, Verl. F. Enke, Stuttgart, 609-12 (1898).

7) : STEVENSON-HAMILTON; The low-Veld, Cassel and comp. London, 38 (1929).

8) : A.A. PORDY; Bull. Dep. Agric. South Rhodes, 1713 (1953).

9) : BOORSMA; med. uits L. Plant, 18-33 (1897).

10) : M.E. WALL, C.S. FENSKE, J.J. WILLMAN, D.S. CORRELL, B.G. SCHUBERT, H.S. GENTRY; J. Amer.Pharm., Ass. Sci. Ed. 44, 438 (1955. Supplem. USA Agric. Res. Serr. ARS-73- 4 (1955).

11) : K.S. PANKAJAMANI, T.R. SESHADRI; J. Sci. Ind. res., 14, 93-8 (1955).

12) : S.L. BATKIA, LAL. MANOHER; Koll-chem. Beih., 1, 48 (1941).

13) : L.H. BAILEY; Manual of Cultivated Plants, 234 (1953).

14) : J.M. HAIS, K. MACEK; Fischer Verlag, Jena, 342-83 (1958).

15) : O.H. WHEELER; Chem. Rev., 62, 205-21 (1962).

16) : R. NEHER, A. WETTSTEIN; Helv. chim. Acta, 34, 2278-85 (1951).

17) : W. NEUDERT, H. RÖPKE; Steroid Spektrenatlas, Springer Verlag, Berlin, Spektr. 275, S. 406, 426 (1965).

18) : E. SALKOWSKY; Analyt. chem., 24, 627 (1885).

19) : O. ROSENHEIM, E. SCHUSTER; Biochem. J., 21, 1329 (1927).

20) : C.H. BRIESKORN, H. HERRIG; Arch. pharm., 292/64, 485 (1959

21) : W. KARRER; Birkhäuser Verl. Stuttgart, 846 (1958).

22) : L.F. FIESER, M. FIESER; Reinhold Publish. Corp., New York, USA, 102-4 (1949).

23) : C. SOSA-BOURDOUIL, A. SOSA; Bull. Soc. chim. biol., 36, 393-404 (1954).

24) : J. SCHREIBER, J. ROCEK, F.H. WESTHEIMER, A. ESCHENMOSER, L. MOLDOVANYI; Helv. chim. Acta, 2559 (1962).

25) : E. MENNINI, J.K. NORYBERSKI; Biochem. J., 84, 195 (1962).

26) : H.P. KAUFMANN, W.H. NITSCH; Fette und Seifen, 56, 473 (1955).

27) : F. MICHEEL, H. SCHWEPPE; Angew. chem., 66, 136 (1954).

28) : H.K. MANGOLD, D.C. MALINS; J. Amer. Oil chemists Soc., 37, 383 (1960).

29) : H. WAGNER, P. POHL; Biochem. Z., 340, 337-44 (1964).

30) : A. GLASER, G. GRIMMER, E. JANTZEN, H. ORTEL; Biochem. Z., 336, 274 (1962).

31) : G. WILHELMI; Arzneimittelforschung, 101, 129 (1960).

32) : R. DODENJOZ; Inst. Rec. Med. and Gem. Practice chim., 165, No. 9, 467 (1952).

33) : R. MAGNUS; Pflügers Arch. ges. Phyiol. Menschen u. Tiere, 102, 123 (1904).

34) : J.H. BURN; Biol. Auswertungsmethoden, Springer Verl. Berlin, 46 (1937).

35) : E. BÜLBRING; Brit. J. Pharmacol., 1, 38 (1946).

36) : R.V. OPPENAUER, H. OBERRAUCH; An. Asoc. quim. aregent., 37, 264 (1949).

37) : TH. J. DE BOER, H.J. BACHER; Org. Synth., Vol. 34, p. 96, Editor Chapma & Hall, London, (1954).

Für die stets gewährten Ratschläge, die mir die Herren Dr. H. B e r t h o l d und Dr. E. G a r t h e während der Durchführung dieser Arbeit gegeben haben, möchte ich mich abschließend herzlich bedanken.

Lebenslauf

Am 26. Juni 1936 wurde ich, Farouk Gamal El-Tayeb, als Sohn des Arzneimittelfabrikanten Gamal Mohi el Dien El-Tayeb und seiner Ehefrau Aischa, geborene Zeihn, in Alexandria geboren.

Nach der üblichen Schulausbildung legte ich im Juni 1955 die Reifeprüfung und 1957 eine Zusatzprüfung in den naturwissenschaftlichen Fächern an der Oberschule El-Inscha ab.

Im Mai 1958 kam ich in die Bundesrepublik Deutschland, nahm am Goethe-Institut in Blaubeuren erfolgreich an einem deutschen Sprachkursus teil und begann im Wintersemester 1958/59 an der Phil.- Theol. Hochschule in Bamberg mit dem Pharmaziestudium, das ich ab Wintersemester 1959/60 an der Universität Würzburg fortsetzte und am 9. April 1962 mit der pharmazeutischen Staatsprüfung abschloss.

Seit August 1962 begann ich unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. R. Pfleger an der vorliegenden Dissertation, die im Mai 1965 ihren praktischen Abschluß fand.